

Entwicklung von zellbasierten Tests zur Erfassung neuer unerwünschter Wirkungen anthropogener Substanzen im Wasser

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Dörthe Sokolis
aus Wolfenbüttel

1. Referentin:

2. Referent:

eingereicht am:

mündliche Prüfung (Disputation) am:

Professor Dr. Ursula M. Bilitewski

Professor Dr. Ludger Beerhues

22.11.2010

27.01.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2009): Funktionalität neuer Tests zur Erfassung von chronischen Wirkungen anthropogener Substanzen. Vom Wasser – Das Journal 107 (2): 7-11.

Tagungsbeiträge

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2008): Neue Tests zur Erfassung chronischer Wirkungen anthropogener Substanzen im Niedrig-Dosis-Bereich. Posterbeitrag, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Trier.

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2008): Neue Tests zur Erfassung von unerwünschten Wirkungen anthropogener Substanzen. Posterbeitrag, 3. Gemeinsame Jahrestagung von SETAC GLB und GDCh, Frankfurt.

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2008): New tests to detect chronic effects of anthropogenic substances on the mammalian immune system. Posterbeitrag, Summer School “Signaling and Immunity”, Goslar.

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2009): Funktionalität neuer Tests zur Erfassung von chronischen Wirkungen anthropogener Substanzen. Posterbeitrag, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Stralsund.

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2010): Diskussion der Anwendbarkeit eines neuen Reporterzell-testsystems zum Nachweis pharmazeutisch wirksamer Substanzen im Wasser. Vortrag, Jahrestagung der Wasserchemischen Gesellschaft, Bayreuth.

Sokolis, D. & Bilitewski, U. (2010): Neue Zell-basierte Tests zum Nachweis pharmazeutisch wirksamer Substanzen im Wasser. Vortrag, 4. Gemeinsame Jahrestagung der GDCh-Fachgruppe Umweltchemie und Ökotoxikologie und der SETAC GLB, Dessau-Roßlau.

***ALL DING' SIND GIFT UND NICHTS OHN' GIFT; ALLEIN DIE
DOSIS MACHT, DASS EIN DING KEIN GIFT IST.***

Paracelsus (1493 - 1541)

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|---|-----------|
| Abbildungsverzeichnis | I |
| Tabellenverzeichnis | II |
| Abkürzungsverzeichnis..... | III |
| Zusammenfassung | VI |
| Abstract | VII |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Problemstellung..... | 1 |
| 1.2 Pharmazeutika in der Umwelt | 2 |
| 1.3 Testsysteme in der aquatischen Ökotoxikologie | 4 |
| 1.3.1 Toxizität..... | 4 |
| 1.3.1.1 <i>Vibrio fischeri</i> | 4 |
| 1.3.1.2 Algen und Cyanobakterien..... | 4 |
| 1.3.1.3 <i>Daphnia sp.</i> | 4 |
| 1.3.1.4 Fische und Fischzelllinien | 5 |
| 1.3.2 Endokrine Wirkungen..... | 6 |
| 1.4 Mechanismen der Immunabwehr | 7 |
| 1.4.1 Allgemeines | 7 |
| 1.4.2 Der NF-κB Signalweg | 9 |
| 1.4.2.1 NF-κB Proteine | 10 |
| 1.4.2.2 Der klassische NF-κB Signalweg..... | 11 |
| 1.4.2.3 Aktivatoren und Zielgene von NF-κB..... | 12 |
| 1.4.2.4 Inhibitoren von NF-κB | 13 |
| 1.4.3 NF-κB in Makrophagen..... | 13 |
| 1.4.4 NF-κB in Epithelzellen | 14 |
| 1.5 Zielsetzung der Arbeit..... | 16 |
| 2 Material und Methoden | 17 |
| 2.1 Material | 17 |
| 2.1.1 Geräte..... | 17 |
| 2.1.2 Verbrauchsmaterial..... | 19 |
| 2.1.3 Chemikalien..... | 19 |
| 2.1.4 Kit-Systeme | 22 |
| 2.1.5 Zytokine | 23 |
| 2.1.6 Antikörper..... | 23 |
| 2.1.7 Plasmide..... | 23 |
| 2.1.8 Puffer und Medien | 25 |
| 2.1.9 Medien und Lösungen für die Zellkultur..... | 26 |
| 2.1.10 Software | 26 |
| 2.2 Methoden..... | 27 |
| 2.2.1 Steriles Arbeiten | 27 |
| 2.2.2 Zellzahlbestimmung | 27 |
| 2.2.3 Kryokonservierung tierischer Zellkulturen..... | 28 |
| 2.2.4 Kultivierung tierischer Zelllinien..... | 28 |

| | |
|--|----|
| 2.2.4.1 RAW 264.7..... | 29 |
| 2.2.4.2 A-549..... | 29 |
| 2.2.5 Herstellung stabil transfizierter Zellen | 30 |
| 2.2.5.1 Isolation des pNiFty2-SEAP Plasmids | 30 |
| 2.2.5.2 Zeocin-Konzentrationsreihe | 30 |
| 2.2.5.3 Transfektion der A-549 Zellen | 30 |
| 2.2.5.4 Selektion stabil transfizierter Zellen..... | 31 |
| 2.2.5.5 Einzelzellklonierung mittels „ <i>Limited Dilution</i> “ | 32 |
| 2.2.5.6 Kultivierung der pNiFty A-549 Zellen (1A11) | 32 |
| 2.2.6 Toxizitätstests | 32 |
| 2.2.6.1 WST-1 | 32 |
| 2.2.6.2 MTT | 33 |
| 2.2.6.3 CFSE | 33 |
| 2.2.7 Indirekter Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)..... | 34 |
| 2.2.7.1 Stimulation und Probenahme | 34 |
| 2.2.7.2 Griess-Reaktion..... | 34 |
| 2.2.8 Nachweis von Zytokinen mittels ELISA..... | 35 |
| 2.2.8.1 Stimulation und Probenahme | 35 |
| 2.2.8.2 ELISA..... | 35 |
| 2.2.9 Detektion des Reporterproteins SEAP..... | 36 |
| 2.2.9.1 Stimulation und Probenahme | 36 |
| 2.2.9.2 SEAP Nachweis mittels MUP Assay | 36 |
| 2.2.10 Kokultivierung von Zelllinien | 37 |
| 2.2.11 Genexpressionsanalysen | 37 |
| 2.2.11.1 Stimulation und RNA Isolation..... | 38 |
| 2.2.11.2 cDNA-Synthese und real-time PCR..... | 38 |
| 2.2.12 SDS-PAGE und Western Blot..... | 40 |
| 2.2.12.1 Stimulation und Zellaufschluss | 40 |
| 2.2.12.2 Proteinbestimmung mittels BCA..... | 41 |
| 2.2.12.3 SDS-PAGE..... | 41 |
| 2.2.12.4 Western Blot..... | 42 |
| 2.2.12.5 Immundetektion..... | 43 |
| 2.2.12.6 Entfernen der Antikörper von der Membran | 43 |
| 2.2.13 Transiente Transfektion der A-549 Zellen..... | 43 |
| 2.2.14 Durchflusszytometrische Analyse der A-549 Zellen..... | 44 |
| 2.3 Arbeiten mit Pharmazeutika und nativen Wasserproben | 45 |
| 2.3.1 Pharmazeutika & Substanzen | 45 |
| 2.3.1.1. Herstellung eines Pharmazeutika-Mixes in DMEM..... | 46 |
| 2.3.2 Native Wasserproben..... | 46 |
| 2.3.2.1 Wasser aus dem Klärwerk Steinhof in Braunschweig..... | 46 |
| 2.3.2.2 Roter Main..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 3 Ergebnisse | 50 |
| 3.1 Beeinträchtigung der physiologischen Zellfunktion | 50 |
| 3.1.1 Funktionsanalyse der verwendeten Zelllinien | 50 |
| 3.1.2 Analyse der Wirkung verschiedener Pharmazeutika | 54 |
| 3.1.2.1 Toxizität | 54 |
| 3.1.2.2 Stickstoffmonoxid-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen..... | 58 |
| 3.1.2.3 Interleukin-Produktion der A-549 Epithelzellen | 61 |
| 3.1.3 Analyse der Wirkung eines Pharmazeutika-Gemisches | 64 |
| 3.1.4 Analyse der Wirkung nativer Wasserproben | 66 |
| 3.1.4.1 Beeinträchtigung der physiologischen Zellfunktion durch native Wasserproben | 66 |
| 3.1.4.2 Effekt des Kläranlagen-Kulturmediums auf die NO-Produktion der RAW 264.7 Zellen | 68 |
| 3.1.4.3 Untersuchungen zum aktivierenden Effekt der Wasserproben | 70 |
| 3.1.5 Kokultivierung von RAW 264.7 und A-549 Zellen | 72 |
| 3.2 Beeinträchtigung der NF-κB-Aktivierung in einem Reporterzellsystem | 74 |
| 3.2.1 Funktionsanalyse der Reporterzellen..... | 74 |
| 3.2.2 Analyse der Wirkung ausgewählter Pharmazeutika auf die NF-κB Aktivierung | 77 |
| 3.2.3 Analyse der Wirkung nativer Wasserproben auf die NF-κB Aktivierung | 78 |
| 3.3 Genexpressionsanalysen..... | 80 |
| 3.3.1 RT ² Profiler [™] PCR Array: <i>Human NF-κB Signaling Pathway</i> | 80 |
| 3.3.2 RT ² Profiler [™] PCR Array: Fokussierte Analyse von Diclofenac, Ibuprofen und nativen Wasserproben | 85 |
| 4 Diskussion | 90 |
| 4.1 Entwicklung und Etablierung der Testsysteme | 90 |
| 4.1.1 Physiologische Zellantworten..... | 90 |
| 4.1.2 Analytische Zellantwort mittels Reporterzellsystem | 92 |
| 4.2 Effekte verschiedener Pharmazeutika auf die Testsysteme..... | 94 |
| 4.2.1 Wirkweise einzelner Pharmazeutika auf die untersuchten Parameter | 94 |
| 4.2.1.1 Bezafibrat | 94 |
| 4.2.1.2 Carbamazepin..... | 95 |
| 4.2.1.3 Diclofenac und Ibuprofen..... | 95 |
| 4.2.2 Wirkweise eines Pharmazeutika-Gemisches auf die untersuchten Parameter..... | 97 |
| 4.3 Effekte nativer Wasserproben auf die Testsysteme..... | 98 |
| 4.3.1 Analyse des Kläranlagen- und des Main-Wassers..... | 98 |
| 4.3.2 Endotoxine im Wasser als NF-κB Aktivatoren | 100 |
| 4.4 Genexpressionsanalysen..... | 101 |
| 4.4.1 Analyse von 84 NF-κB assoziierten Genen (NF-κB PCR Array) | 101 |
| 4.4.2 Analyse von 10 NF-κB assoziierten Genen (Custom-made Array)..... | 102 |
| 4.5 Umweltrelevanz und Bewertung der Testsysteme | 105 |
| 4.5.1 Umweltrelevanz | 105 |
| 4.5.2 NF-κB als Testsystem..... | 107 |

| | |
|--|------------|
| 4.5.3 Fazit & Ausblick..... | 109 |
| 5 Literatur | 110 |
| 6 Anhang | 118 |
| 6.1 Genlisten der SABiosciences TM PCR Arrays | 118 |
| 6.1.1 Human NF-κB Signaling Pathway RT ² Profiler TM PCR Array | 118 |
| 6.1.2 Custom-made RT ² Profiler TM PCR Array..... | 120 |
| 6.2 Rohdaten (CP-Werte) der SABiosciences TM PCR Arrays..... | 121 |
| 6.2.1 Human NF-κB Signaling Pathway RT ² Profiler TM PCR Array | 121 |
| 6.2.2 Custom-made RT ² Profiler TM PCR Array..... | 126 |
| Danksagung..... | 129 |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|-------------|---|----|
| Abb. 1.1: | Übersicht der in der Umwelt häufig vorkommenden Pharmazeutika..... | 2 |
| Abb. 1.2: | Prinzip der CALUX®-Bioassays..... | 6 |
| Abb. 1.3: | Entzündungsreaktion nach bakterieller Infektion..... | 8 |
| Abb. 1.4: | TIR-Domänen in Rezeptoren der Immunabwehr von Säugetieren..... | 9 |
| Abb. 1.5: | Beteiligung von NF-κB an zellulären Prozessen..... | 10 |
| Abb. 1.6: | NF-κB Proteine in Säugetierzellen..... | 11 |
| Abb. 1.7: | Schema des klassischen NF-κB Signalwegs..... | 12 |
| Abb. 1.8: | Biosynthese von Stickstoffmonoxid..... | 14 |
| Abb. 1.9: | Übersicht sekretierter Moleküle von Epithelzellen während der Immunantwort.... | 14 |
| Abb. 2.1: | Vektorkarte pNiFty2-SEAP von InvivoGen..... | 24 |
| Abb. 2.2: | Restriktionskarte des pEGFP-C1 Vektors..... | 24 |
| Abb. 2.3: | Zählgitter einer <i>Neubauer improved</i> Zählkammer..... | 27 |
| Abb. 2.4: | Kontrollzellen (A) nach 10 d Kultivierung in Selektionsmedium und transfizierte Zellen (B) nach dem gleichen Zeitraum..... | 31 |
| Abb. 2.5: | Layout des Human NF-κB Signaling Pathway RT ² Profiler™ PCR Arrays..... | 37 |
| Abb. 3.1: | NF-κB Aktivierung in A-549 und RAW 264.7 Zellen durch IL-1β bzw. LPS..... | 50 |
| Abb. 3.2: | Translokation des p65-Proteins in A-549 Zellen..... | 51 |
| Abb. 3.3: | 5-Tage MTT-Test für BAY 11-7082 in den A-549 Zellen..... | 52 |
| Abb. 3.4: | NO-Produktion in RAW 264.7 Zellen..... | 53 |
| Abb. 3.5: | Zytokin-Produktion der A-549 Zellen..... | 54 |
| Abb. 3.6: | WST-Tests mit den RAW 264.7 Zellen..... | 55 |
| Abb. 3.7: | CFSE-Tests mit den RAW 264.7 Zellen..... | 56 |
| Abb. 3.8: | MTT-Tests mit den A-549 Zellen..... | 57 |
| Abb. 3.9: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Acetylsalicylsäure (Ace), Bezafibrat (Bez) oder Naproxen (Nap) behandelten RAW 264.7 Makrophagen.... | 58 |
| Abb. 3.10: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Carbamazepin (Car), Cyclophosphamid (Cyc) oder Metoprolol (Met) behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 59 |
| Abb. 3.11: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Diclofenac (Dic), Ibuprofen (Ibu) oder Clofibrinsäure (Clo) behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 59 |
| Abb. 3.12a: | Interleukin-6 Produktion der mit IL-1β stimulierten und mit Diclofenac (Dic) oder Carbamazepin (Car) behandelten A-549 Epithelzellen..... | 61 |
| Abb. 3.12b: | Interleukin-6 Produktion der mit IL-1β stimulierten und mit Bezafibrat behandelten A-549 Epithelzellen..... | 62 |
| Abb. 3.13: | Interleukin-8 Produktion der mit IL-1β stimulierten und mit Diclofenac (Dic) oder Carbamazepin (Car) behandelten A-549 Epithelzellen..... | 62 |
| Abb. 3.14: | Einfluss von Diclofenac auf die Morphologie der A-549 Zellen..... | 63 |
| Abb. 3.15: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 64 |
| Abb. 3.16: | IL-6 Produktion der mit IL-1β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten A-549 Epithelzellen..... | 65 |
| Abb. 3.17: | IL-8 Produktion der mit IL-1β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten A-549 Epithelzellen..... | 65 |
| Abb. 3.18: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit nativen Wasserproben behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 66 |
| Abb. 3.19: | NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit nativen Wasserproben..... | 67 |
| Abb. 3.20: | IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen nach Behandlung mit nativen Wasserproben..... | 68 |
| Abb. 3.21: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Zulauf- und Ablauf-DMEM behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 69 |

| | | |
|------------|---|-----|
| Abb. 3.22: | NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit Zulauf- und Ablauf-DMEM..... | 69 |
| Abb. 3.23: | NO-Produktion der mit LPS stimulierten/unstimulierten und mit Methoxychlor behandelten RAW 264.7 Makrophagen..... | 70 |
| Abb. 3.24: | NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit Endotoxin-freiem Zulauf-Wasser..... | 71 |
| Abb. 3.25: | IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen in Kokultur mit RAW 264.7 Makrophagen..... | 72 |
| Abb. 3.26: | SEAP-Produktion der 1A11 Zellen..... | 75 |
| Abb. 3.27: | SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit BAY 11-7082 behandelten 1A11 Zellen..... | 76 |
| Abb. 3.28: | SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit den angegebenen PDTC-Konzentrationen behandelten 1A11 Zellen..... | 76 |
| Abb. 3.29: | SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit Diclofenac (Dic), Carbamazepin (Car) oder Ibuprofen (Ibu) behandelten 1A11 Zellen..... | 77 |
| Abb. 3.30: | SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten 1A11 Zellen..... | 78 |
| Abb. 3.31: | SEAP-Produktion der 1A11 Zellen nach Behandlung mit nativen Wasserproben..... | 79 |
| Abb. 3.32: | Expression der Gene <i>ICAM1</i> , <i>IL-6</i> und <i>IL-8</i> nach verschiedenen Behandlungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung..... | 81 |
| Abb. 3.33: | Expression der Gene <i>NFKBIA</i> , <i>IKBKB</i> und <i>IKBKE</i> nach verschiedenen Behandlungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung..... | 83 |
| Abb. 3.34: | Expression der ausgewählten Gene in A-549 Zellen bei Behandlung mit IL-1 β und den angegebenen (A) Diclofenac- und (B) Ibuprofen-Konzentrationen..... | 88 |
| Abb. 3.35: | Expression der ausgewählten Gene nach Behandlung der A-549 Zellen mit (A) 1:2- und (B) 1:4-Verdünnungen der nativen Wasserproben im Vergleich zur Kontrollbehandlung..... | 89 |
| Abb. 4.1: | Beteiligung von NF- κ B an der <i>COX-2</i> Genexpression..... | 96 |
| Abb. 4.2: | Konsequenzen einer Aktivierung von IKK α | 107 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tab. 2.1: | Zellkulturgefäße und Kulturvolumina..... | 28 |
| Tab. 2.2: | Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel..... | 42 |
| Tab. 2.3: | Überblick über die verwendeten Pharmazeutika..... | 45 |
| Tab. 2.4: | Standard-Parameter der Klärwerkproben..... | 47 |
| Tab. 2.5: | Pharmazeutika-Konzentrationen Zulauf- und Ablauf-Wasser..... | 47 |
| Tab. 2.6: | Pharmazeutika-Konzentrationen Roter Main..... | 49 |
| Tab. 3.1: | Vitalität [%] der mit LPS und den Pharmazeutika behandelten RAW 264.7 Zellen..... | 60 |
| Tab. 3.2: | Zusammenfassung der im RT ² PCR Array untersuchten Behandlungen der A-549 Epithelzellen..... | 81 |
| Tab. 3.3: | <i>Fold Change</i> ausgewählter Gene im Vergleich zur Kontrollbehandlung..... | 84 |
| Tab. 3.4: | <i>Fold Change</i> Werte der für den <i>custom-made</i> RT2 PCR Array ausgewählten Gene im NF- κ B Signaling Pathway Array im Vergleich zur Kontrollbehandlung..... | 85 |
| Tab. 3.5: | Zusammenfassung der im <i>custom-made</i> RT ² PCR Array untersuchten Behandlungen der A-549 Epithelzellen..... | 86 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------|---|
| % | Prozent |
| °C | Grad Celsius |
| µg | Mikrogramm; 10 ⁻⁶ Gramm |
| µL | Mikroliter; 10 ⁻⁶ Liter |
| µm | Mikrometer; 10 ⁻⁶ Meter |
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| Ace | Acetylsalicylsäure |
| AP-1 | Aktivator-Protein1 |
| AR CALUX | Androgen CALUX |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| Bez | Bezafibrat |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CALUX | engl. <i>chemical-activated luciferase expression</i> |
| Car | Carbamazepin |
| cDNA | engl. <i>complementary DNA</i> |
| CFSE | 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat <i>N</i> -succinimidylester |
| Clo | Clofibrinsäure |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzentimeter |
| CP | engl. <i>crossing point</i> |
| Cyc | Cyclophosphamid |
| d | Tag |
| d. h. | das heißt |
| DDT | Dichlordiphenyltrichlorethan |
| dest. | destilliert |
| Dic | Diclofenac |
| DIN | Deutsches Institut für Normung e.V. |
| DMEM | engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DOC | engl. <i>dissolved organic carbon</i> |
| DR CALUX | Dioxin CALUX |
| DSMZ | Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGFP | engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| ELAM | engl. <i>endothelial cell-leukocyte adhesion molecule</i> |
| ELISA | engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| engl. | englisch |
| ER CALUX | Östrogen CALUX |
| et al. | et alii |
| etc. | et cetera |
| EU | Endotoxin Unit / Europäische Union |
| evtl. | eventuell |

| | |
|--------|---|
| FACS | engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i> |
| FBS | engl. <i>fetal bovine serum</i> |
| g | Gramm |
| GOI | engl. <i>gene of interest</i> |
| h | Stunde |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie |
| HZI | Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung |
| Ibu | Ibuprofen |
| ICAM-1 | interzelluläres Adhäsionsmolekül 1 |
| IFN | Interferon |
| IKK | IκB Kinase |
| IL | Interleukin |
| IMDM | engl. <i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i> |
| inkl. | inklusive |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase |
| ISO | Internationale Organisation für Normung |
| IκB | Inhibitor von NF-κB |
| KA | Kläranlage |
| km | Kilometer |
| L | Liter |
| LB | engl. <i>lysogeny broth</i> , Medium für die Bakterienkultur |
| LC | Flüssigkeitschromatographie |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mA | Milliampere; 10^{-3} Ampere |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Proteinkinase |
| Met | Metoprolol |
| mg | Milligramm; 10^{-3} Gramm |
| min | Minute |
| mL | Milliliter; 10^{-3} Liter |
| mRNA | <i>messenger</i> RNA |
| mS | Millisiemens |
| MS | Massenspektrometrie |
| MTT | 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid |
| MUP | 4-Methylumbelliferylphosphat |
| Mxc | Methoxychlor |
| N/A | nicht verfügbar (<i>not available</i>) |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| Nap | Naproxen |
| NEMO | NF-κB essentieller Modulator |
| NF-κB | nuklearer Faktor kappa B |
| ng | Nanogramm; 10^{-9} Gramm |
| nm | Nanometer; 10^{-9} Meter |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| NSAID | nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente |
| OD | optische Dichte |
| OECD | Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung |
| p.a. | <i>pro analysi</i> |
| PAMP | engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> |

| | |
|----------------------|--|
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline (<i>phosphate-buffered saline</i>) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| PDTC | Pyrrolidindithiocarbamat |
| PFA | Paraformaldehyd |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration |
| PPAR | Peroxisomen-Proliferator-aktivierter Rezeptor |
| PRR | engl. <i>pattern-recognition receptor</i> |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid |
| REACH | engl. <i>Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals</i> |
| RFU | relative Fluoreszenzeinheit (<i>relative fluorescence unit</i>) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNS | reaktive Stickstoffspezies (<i>reactive nitrogen species</i>) |
| ROS | reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>) |
| rpm | Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>) |
| RPMI | engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RT ² -PCR | reverse Transkriptase, <i>real-time</i> Polymerasekettenreaktion |
| SEAP | sekretorische embryonische alkalische Phosphatase |
| sec | Sekunde |
| SF | serumfrei |
| SL | Stammlösung |
| Smx | Sulfamethoxazol |
| sog. | sogenannte/n/r |
| STAT1 | engl. <i>signal transducer and activator of transcription 1</i> |
| Tab. | Tabelle |
| TBS-T | Tris-gepufferte Saline-Tween 20 (<i>tris-buffered saline Tween 20</i>) |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| TIR | Toll/Interleukin-Rezeptor |
| TIRAP | TIR-Domäne enthaltendes Adaptorprotein |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TMB | Tetramethylbenzidin |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TOC | engl. <i>total organic carbon</i> |
| u. a. | unter anderem |
| ÜN | über Nacht |
| V | Volt |
| vgl. | vergleiche |
| WST-1 | 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzol-disulfonat |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| YES | engl. <i>yeast estrogen screen</i> |
| z. B. | zum Beispiel |
| z. T. | zum Teil |

ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand dieser Arbeit war die Entwicklung und Etablierung von neuen Testsystemen zum Nachweis von unerwünschten Wirkungen anthropogener Substanzen im Wasser. Die bereits bestehenden Testmethoden in der aquatischen Ökotoxikologie basieren zumeist auf der Untersuchung von spezifischen Funktionen bestimmter Organismen. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, Substanzen mit endokriner Wirkung verlässlich nachzuweisen, z. B. mit Hilfe der CALUX®-Assays. Diese Tests erlauben jedoch nur eine begrenzte Aussage über die tatsächliche Wirkung der in der Probe vorhandenen Stoffe auf den Organismus. Mittlerweile werden in der Umwelt vor allem pharmazeutische Substanzen, wie Entzündungshemmer, gefunden. Ziel der hier durchgeführten Untersuchungen war daher, Testsysteme zu entwickeln, mit denen nicht akut-toxische, spezifische Effekte von pharmazeutischen Wirkstoffen detektiert werden können.

Entzündungsreaktionen entstehen durch die Stimulation von Zellen, die an der Immunabwehr beteiligt sind. Als Vertreter wurden murine Makrophagen (RAW 264.7) sowie humane Lungenepithelzellen (A-549) gewählt. Durch Zugabe von Endotoxinen oder Zytokinen lässt sich in diesen Zellen der NF- κ B Signalweg wie bei einer Entzündungsreaktion aktivieren. Die physiologischen Antworten der Zellen auf die Stimulation (NO- bzw. Interleukin-Produktion) konnten dann in entsprechenden Assays detektiert werden. Zusätzlich wurden die Epithelzellen stabil mit einem NF- κ B-Reporterplasmid transfiziert, so dass die Aktivierung von NF- κ B über die Bildung eines Reporterproteins nachgewiesen werden konnte. Durch Zugabe von ausgewählten Pharmazeutika, definierten Mischungen oder Wasserproben konnten so die Effekte dieser Substanzen auf die NF- κ B-Signalkaskade untersucht werden. Außerdem sollten Genexpressionsanalysen einen umfassenderen Überblick über die Beeinflussung von 84 NF- κ B assoziierten Genen liefern.

Mit Hilfe der physiologischen Parameter und des Reporterzellsystems konnten für zehn verschiedene Pharmazeutika (z. B. Diclofenac und Ibuprofen) keine Effekte auf die NF- κ B Aktivierung in umweltrelevanten Konzentrationsbereichen detektiert werden. Native Wasserproben aktivierten den Signalweg, was aber auf die Anwesenheit von Endotoxinen und/oder deren Bestandteile zurückgeführt werden konnte. Auch die Genexpressionsdaten zeigten keine Auffälligkeiten. Die grundsätzliche Funktionalität der Testsysteme konnte jedoch gezeigt werden, so dass eine Anwendung in der Umweltanalytik nach notwendigen Optimierungen möglich ist.

ABSTRACT

The objective of this work was the development and establishment of new test systems in order to determine undesired effects of anthropogenic substances in water. The existing test methods in the field of aquatic eco-toxicology are mostly based on the analysis of specific functions of certain organisms. Furthermore, endocrine-active substances can be detected, for example, with the help of CALUX[®] Assays. However, these tests only allow a limited statement concerning the real effects of the substances in the sample. The most common compounds found in the environment are pharmaceutical substances such as anti-inflammatory drugs. Therefore, the aim of these studies has been to develop test systems with which both non-acute toxicity and specific effects of the drugs themselves can be detected.

The inflammatory response develops after the stimulation of cells involved in the immune defence. Murine macrophages (RAW 264.7) and human lung epithelial cells (A-549) were therefore chosen as representative cell lines. The addition of endotoxins or cytokines activates the NF- κ B signalling pathway in these cells. The physiological response of these cells to the stimulation (NO or interleukin production) could thus be detected with corresponding assays. Additionally, the epithelial cells were stably transfected with an NF- κ B reporter plasmid and the activation of NF- κ B was monitored via the production of a reporter protein. The addition of selected pharmaceuticals, defined mixtures or native water samples enabled an examination of the effects of the substances on the NF- κ B signalling cascade. Furthermore, gene expression analysis gave an overview of the regulation of 84 NF- κ B associated genes.

No effects on the activation of NF- κ B could be observed for ten different pharmaceuticals (e.g. Diclofenac, Ibuprofen) in environmentally relevant concentrations, by using the physiological parameters and the reporter cell system. Native water samples activated the signalling pathway but this was attributable to the presence of endotoxins and/or their components. Gene expression data did not reveal distinctive features. Thus, although the test systems are functional in principle, their application to environmental analyses will only be possible after further optimisation.

1 EINLEITUNG

1.1 Problemstellung

In zunehmendem Maß werden in der Umwelt Substanzen anthropogenen Ursprungs gefunden. Dabei handelt es sich nicht mehr nur um gefährliche oder prioritär gefährliche Stoffe, also Stoffe, die toxisch, persistent und bioakkumulierbar sind, wie etliche Schwermetalle, Industriechemikalien und Pflanzenschutzmittel, sondern auch um Substanzen, die über den alltäglichen Gebrauch in die Umwelt gelangen. Dazu gehören pharmazeutische Wirkstoffe aus der human- und veterinärmedizinischen Therapie, Diagnostika [Daughton & Ternes 1999; Fent *et al.*, 2006; Nikolaou *et al.* 2007], aber auch Bestandteile von Sonnenschutzmitteln, Duftstoffe und Konservierungsmittel [Caliman & Gavrilescu, 2009]. Diese kommen nicht nur in Abwässern vor, sondern auch in Oberflächengewässern, wie Seen oder Flüssen, im Grundwasser und in einigen Fällen sogar im Trinkwasser [Webb *et al.*, 2003]. Sie gelangen zum Teil direkt in den Wasserkreislauf, zum Beispiel Sonnenschutzmittel beim Baden in Seen oder Flüssen, oder kommen aus Kläranlagen, die sie passiert haben, ohne im nennenswerten Umfang abgebaut oder zurückgehalten worden zu sein [Joss *et al.*, 2006]. Die nachgewiesenen Konzentrationen bewegen sich dabei im ng/L- sowie im µg/L-Bereich, so dass man derzeit von organischen Spurenstoffen spricht. Durch den stetigen Anstieg des Arzneimittelkonsums [Fent *et al.*, 2006; Fox & Ward 2008] und die sich verbessernden Nachweismethoden [Ternes, 2001] ist davon auszugehen, dass die Konzentrationen steigen und die Stofflisten länger werden. Allerdings ist eine akute Toxizität dieser Substanzen und damit eine direkte Gefährdung auch aquatischer Organismen nicht anzunehmen, obwohl bereits in den späten 90er Jahren gezeigt worden war, dass Spurenstoffe mit hormoneller Wirkung, zum Beispiel Wirkstoffe der Antibabypille, zu einer Verweiblichung von Beständen aquatischer Lebewesen (Fische, Frösche) geführt haben und damit langfristig den Bestand gefährden [Jobling *et al.*, 1998; Länge *et al.*, 2001]. Inwieweit von den mit heutigen Methoden gefundenen, immer neuen Spurenstoffen noch andere unerwünschte Wirkungen ausgehen, die möglicherweise auf chronische Effekte der unkontrollierten Substanzmischungen zurückgehen, ist derzeit noch unklar. Daher kommt der Detektion dieser Wirkungen eine immer größere Bedeutung zu. Vor diesem Hintergrund wurden neben den Toxizitätstests, Tests auf Schädigungen des Erbmaterials (gentoxische Effekte) [Ames *et al.*, 1975; Grummt *et al.*, 2009] und auf endokrine Wirkungen [Routledge & Sumpter, 1996] etabliert. Ein weiterer möglicher Angriffspunkt von

Umweltchemikalien ist das Immunsystem [Luster & Rosenthal 1993], dessen Schädigung zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen aber auch für Krebs führt, was ebenfalls ein Ökosystem oder den Menschen gefährden kann. Im Folgenden werden daher zunächst die Pharmazeutika vorgestellt, die derzeit am häufigsten im Wasser gefunden werden, sowie die wichtigsten Tests auf toxische und endokrine Wirkungen. Außerdem werden wesentliche Komponenten des Immunsystems beschrieben, um daraus Ansätze für mögliche Wirktests abzuleiten.

1.2 Pharmazeutika in der Umwelt

Unter den in der Umwelt gefundenen Pharmazeutika befinden sich eine ganze Reihe von verschiedenen Wirk- und Substanzklassen [Nikolaou *et al.*, 2007]. Einen Überblick über die Vielfalt gibt Abbildung 1.1. Den mit Abstand größten Teil stellen die nichtsteroidalen antiinflammatorischen Medikamente (NSAID), zu denen die unter dem Handelsnamen Aspirin[®] bekannte Acetylsalicylsäure gehört. Aber auch weitere bekannte Schmerzstiller (Analgetika) wie Diclofenac oder Ibuprofen gehören zu dieser Gruppe. Die Wirkung dieser Arzneien beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenasen [Vane & Botting, 1995]. Es sind zwei Isoformen bekannt, COX-1 und COX-2, wobei COX-1 eine konstitutiv exprimierte und COX-2 eine induzierbare Form darstellt.

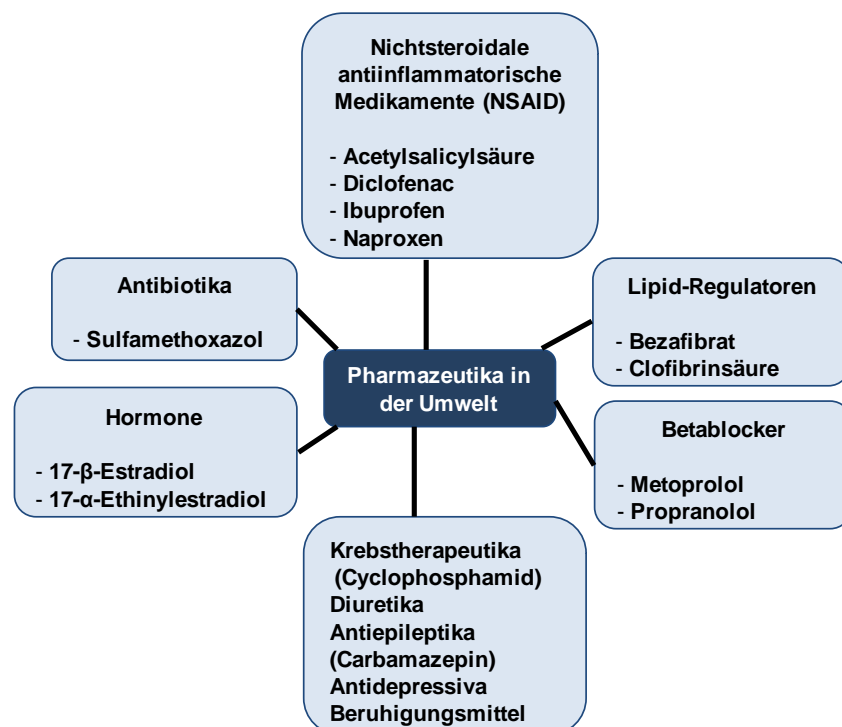


Abb. 1.1: Übersicht der in der Umwelt häufig vorkommenden Pharmazeutika verändert nach [Nikolaou *et al.*, 2007]

Beide COX-Isoformen katalysieren die Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure [Mitchell & Warner, 1999]. Die NSAID Medikamente hemmen nicht-selektiv beide Cyclooxygenasen, wobei die entzündungshemmende Wirkung jedoch auf die Hemmung der COX-2 zurückzuführen ist, während eine Hemmung der COX-1 zum großen Teil für die Nebenwirkungen dieser Pharmazeutika verantwortlich ist [Warner & Mitchell, 2004]. Die Induktion der COX-2 Genexpression ist abhängig von der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors. Hierbei handelt es sich um den nuklearen Faktor kappa B (NF- κ B), dem in inflammatorischen Signalwegen eine große Bedeutung zukommt (1.4.2). Die zentrale Rolle von Prostaglandinen und von NF- κ B deutet daraufhin, dass es durchaus zu unerwünschten Effekten auf Organismen kommen kann. Beispielsweise löste Diclofenac bei Geiern in Indien einen drastischen Populationsrückgang aufgrund von Nierenversagen aus. Die Hauptnahrungsquelle dieser Tiere war dabei mit Diclofenac behandeltes Nutzvieh [Oaks *et al.*, 2004], so dass über die Nahrung große Mengen dieser Substanz aufgenommen wurden. Eine weitere große Gruppe von schädlichen Substanzen in der Umwelt stellen die hormonaktiven Substanzen dar. Hierbei handelt es sich z. B. um das synthetische Östrogen Ethinylestradiol, einem Hauptbestandteil der Antibabypille. Dieses künstliche Hormon wird vom Körper wieder ausgeschieden und ist im ng/L-Bereich in Abwässern und Oberflächengewässern nachzuweisen [Kümmerer, 2001]. Hormone sind bereits in geringen Konzentrationen wirksam, so dass auch hier eine schädliche Wirkung in Form einer Beeinträchtigung der Reproduktion von Organismen möglich ist [Länge *et al.*, 2001]. Weitere in der Umwelt vorkommende Substanzklassen sind Antibiotika, Lipid-Regulatoren, Beta-Blocker und diverse andere Substanzen (Abb. 1.1), wie das Antiepileptikum Carbamazepin, welches zu einer Blockade von Natriumkanälen in neuronalen Zellen führt [Neels *et al.*, 2004]. Die vielen unterschiedlichen Klassen und Wirkweisen machen neue Tests auf mögliche schädigende Effekte notwendig.

1.3 Testsysteme in der aquatischen Ökotoxikologie

Die Ökotoxikologie befasst sich mit den Auswirkungen anthropogener Substanzen auf die belebte Natur. Untersuchungsmethoden in der aquatischen Ökotoxikologie basieren zumeist auf Tests mit verschiedenen Organismengruppen. Zum Einsatz kommen dabei unter anderem Bakterien, Algen, Wasserpflanzen, Krebstiere und Fische [Fent, 2003].

1.3.1 Toxizität

1.3.1.1 *Vibrio fischeri*

Die Verwendung bakterieller Kurzzeittests ist weit verbreitet, da die schnelle Generationszeit und eine hohe Stoffwechselaktivität einen akuten Toxizitätsnachweis erlauben [Fent, 2003]. Die Bakterienart *Aliivibrio fischeri*, bis 2007 *Vibrio fischeri* [Urbanczyk *et al.*, 2007], wird als marines Photobakterium im sogenannten Leuchtbakterientest verwendet [Rosal *et al.*, 2010]. Dafür gibt es eine Standardmethode, die nach ISO 11348-3 festgelegt ist. Die Bakterien besitzen unter bestimmten Kulturbedingungen die Fähigkeit zur Biolumineszenz. Die gleichmäßige Lumineszenz kann durch schädliche Substanzen beeinträchtigt werden, was eine Reduktion der Lichtemission zur Folge hat. Die toxischen Effekte von Substanzen werden dann über die prozentuale Abnahme der Lumineszenz gemessen.

1.3.1.2 Algen und Cyanobakterien

Für Untersuchungen zur Hemmung des Wachstums von Grünalgen werden meist *Scenedesmus*-Spezies verwendet [DIN 38412-L9]. Dieses Testverfahren basiert auf der Hemmung der Zellvermehrung, eine Auswertung erfolgt über eine Wachstumskurve [Fent, 2003]. Eine neuere Methode beschreibt einen Test mit Hilfe des Cyanobakteriums *Anabaena sp.* [Rosal *et al.*, 2010]. Der Testorganismus ist dabei genetisch modifiziert, so dass es zu einer konstitutiven Lumineszenz kommt. Störungen durch die Anwesenheit von toxischen Substanzen können dann, wie im Leuchtbakterientest (1.1.2.1), durch eine Lumineszenzreduktion detektiert werden.

1.3.1.3 *Daphnia sp.*

Die zur Gruppe der Cladocera (Blattfußkrebse) gehörenden *Daphnia*-Spezies sind als Testorganismus für den Nachweis akuter und chronischer Toxizität von großer Bedeutung [Fent, 2003]. Häufig verwendete Arten sind *Daphnia magna* und *Daphnia pulex*. Der Daphnien-Kurzzeittest ist in der DIN 38412-L11 festgelegt. Hierbei wird als Messparameter die Mobilität der Krebse nach Substanzzugabe ausgewertet. Die Schwimmunfähigkeit gilt

dann als Zeichen für einen akut toxischen Effekt. Des Weiteren gibt es nach der OECD Guideline 202 einen Test auf chronische Effekte. Der Reproduktionstest erfolgt über bis zu drei Wochen und gibt Aufschlüsse über die Reproduktionsraten der Tiere. Als problematisch haben sich hierbei sowohl abiotische Parameter, wie Temperatur, Licht und pH-Wert, als auch biotische Faktoren, wie der *Daphnien*-Stamm, herausgestellt [Persoone *et al.*, 2009].

1.3.1.4 Fische und Fischzelllinien

Als komplexes Nachweissystem ökotoxikologischer Wirkungen kommen zumeist warmadaptierte Fische wie die Goldorfe oder der Zebrafisch zum Einsatz. Die OECD Guideline 203 beschreibt eine akute Fischtoxizitätsprüfung, bei der die tödliche Wirkung von Substanzen auf junge Fische nach 24 – 96 h bestimmt wird. Eine gesonderte Stellung kommt dem Test auf Schädigungen in der Entwicklung des Organismus zu. Die Richtlinie 210 der OECD legt einen sogenannten *Early Life Stage Test* (ELST) fest, welcher die Analyse von Effekten auf Wachstum und Mortalität im Larvenstadium beinhaltet. Hinzu kommt ein Test, der den ganzen Lebenszyklus des Fisches in Beobachtungen mit einbezieht (*Life Cycle Test*, LCT) [Fent, 2003]. Die Untersuchungen am Gesamtorganismus haben jedoch auch einige Nachteile. Die seit Mitte 2007 bestehende EU-Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006) trägt dazu bei, dass eine Entwicklung von Alternativen zu Tierversuchen weiter vorangetrieben wird [Lilienblum *et al.*, 2008]. Die Verordnung besagt, dass alle Chemikalien, sowohl neue als auch jene auf dem Markt befindlichen, einer Risikoprüfung unterzogen werden müssen. Das heißt, dass für alle im Umlauf befindlichen Stoffe unter anderem umweltbezogene Angaben, so auch zur Toxizität, gemacht werden müssen. Die Einhaltung der Vorgaben würde eine immens große Anzahl an Versuchstieren nötig machen, welche die Kapazitäten vieler wissenschaftlicher Einrichtungen überschreiten würde und auch die Gefahr von falsch-positiven Effekten birgt [Knight, 2008]. Neben computergestützten Modellierungen rücken daher zelluläre *In-vitro* Systeme immer mehr in den Vordergrund. In der Ökotoxikologie kommen dabei zunehmend permanente Fisch-Zellkulturen zum Einsatz, mit deren Hilfe die akute Toxizität von Substanzen detektiert werden kann [Fent, 2007]. Zellschädigungen können dann in den kultivierten Zellen einfach über Zytotoxizitätsassays nachgewiesen werden. Durch den Einsatz von Substanzen, die z. B. eine Schädigung der Zellmembran oder die Hemmung von mitochondrialen Enzymen anzeigen, können Aussagen über die toxische Wirkung von Chemikalien getroffen werden [Fent, 2003]. Ein breites Spektrum an kommerziell erhältlichen Zelllinien erlaubt eine Durchführung der Tests nicht nur mit Zellen aquatischer Organismen sondern auch in Säugetierzelllinien, z. B. in Zellen aus

Maus und Mensch. Daher kommt den *In-vitro* Systemen als Untersuchungsmethoden aufgrund der einfachen Handhabbarkeit und Reproduzierbarkeit eine immer größere Bedeutung zu. Ein Beispiel für den Einsatz rein zellulärer, Organismen-unabhängiger Systeme ist der Nachweis von endokrinen Wirkungen.

1.3.2 Endokrine Wirkungen

Substanzen mit östrogenen Aktivität können mit Hilfe des YES-Tests (*Yeast Estrogen Screen*) nachgewiesen werden [Routledge & Sumpter, 1996]. Dieser basiert auf genetisch modifizierten Hefezellen, die den menschlichen Östrogen-Rezeptor exprimieren. Bei Anwesenheit von Östrogen-aktiven Substanzen in der Probe wird dieser aktiviert und induziert die Transkription eines durch Substratzugabe einfach nachzuweisenden Enzyms. Weiterentwicklungen dieser Methode greifen das Prinzip auf, verwenden jedoch als Testsystem Säugetierzelllinien [Murk *et al.*, 1996; Legler *et al.*, 1999]. In den sogenannten CALUX-Assays (*Chemical-Activated Luciferase Expression*) werden genetisch modifizierte Zellen verwendet, in welchen die DNA-Sequenz des spezifischen Hormon-responsiven Elements (*Chemical Responsive Element*, CRE) mit einem leicht nachweisbaren Protein, hier Luciferase, gekoppelt und mittels Transfektion eingebracht wurde. Durch die Integration in das Zellgenom erhält man stabil transfizierte Zellen. Dieses System ist als CALUX[®]-Bioassay in verschiedenen spezifischen Varianten bei der Firma BDS BioDetection Systems erhältlich. Mit den DR-, AR- und ER-CALUX[®]-Assays können Dioxin oder Dioxin-ähnliche Substanzen sowie Androgen- und Östrogen-aktive Substanzen nachgewiesen werden [Sonneveld *et al.*, 2005; Sonneveld *et al.*, 2006]. Das Nachweisprinzip zeigt Abbildung 1.2.

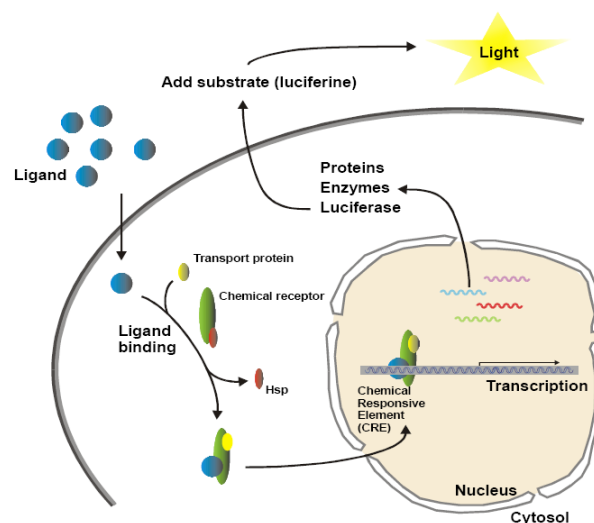


Abb. 1.2: Prinzip der CALUX[®]-Bioassays
[155 BDS CALUX Panel 2010 Water Testing]

Die Grundlage der kommerziell erhältlichen Assays bildet die genetisch modifizierte humane Zelllinie U-2 OS. Diese Zellen werden mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Sind die entsprechenden Substanzen in der Probe vorhanden (blau in Abb. 1.2), so binden diese intrazellulär an einen spezifischen Rezeptor (grün in Abb. 1.2). Rezeptor und Ligand gelangen dann in den Zellkern und aktivieren dort die Expression des Reportergens. Das entstehende Enzym (Luciferase) kann durch Zugabe des Substrats Luciferin über die Lichtemission nachgewiesen werden. Das System wird erfolgreich auch für die Untersuchung von Wasserproben eingesetzt und zeigt dabei eine hohe Sensitivität beim Nachweis der verschiedenen hormonellen Wirkungen [van der Linden *et al.*, 2008].

Unter den in der Umwelt nachweisbaren Substanzen spielen neben den hormonaktiven Stoffen die entzündungshemmenden Pharmazeutika eine große Rolle, deren Anwesenheit oder eine eventuell schädigende Wirkung mit den vorgestellten Testsystemen bislang nicht erfasst werden kann, da sie keine akut-toxischen Effekte zeigen und keine Wechselwirkungen mit Hormonrezeptoren eingehen.

1.4 Mechanismen der Immunabwehr

1.4.1 Allgemeines

Das Immunsystem von Wirbeltieren basiert auf zwei verschiedenen Prinzipien. Die angeborene Immunabwehr, die auch schon bei wirbellosen Tieren vorkommt, ist eine unspezifische Reaktion auf eindringende Krankheitserreger, sogenannte Pathogene, und ist damit die erste Verteidigungslinie gegen Fremdstoffe. Dazu gehören z. B. physikalische oder mechanische Barrieren wie die Epithelzellen der Haut und der Schleimhäute. Im Laufe der Evolution der Wirbeltiere ist die spezifische oder adaptive Immunantwort entstanden. Die Bekämpfung eines Pathogens ist daher in höheren Organismen immer ein Zusammenspiel beider Mechanismen, wobei die adaptive durch die angeborene Immunantwort aktiviert wird [Alberts *et al.*, 2002]. Die zelluläre Basis der Immunantworten sind die weißen Blutzellen oder Leukozyten, die im Knochenmark gebildet werden. Daraus entwickeln sich im Laufe der Hämatopoese (Blutzellbildung) die verschiedenen Zelltypen des Immunsystems. Makrophagen („Fresszellen“) entstehen aus Monozyten, die in Gewebe einwandern. Sie sind als phagozytierende Zellen wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Dringen Pathogene in ein Gewebe ein, werden sie von den Makrophagen erkannt, phagozytiert (internalisiert) und abgetötet. Außerdem senden die Makrophagen Signalstoffe zur Aktivierung weiterer Zellen des Immunsystems aus, so dass es zu einer Entzündungsreaktion

kommt. Für die Erkennung der Pathogene besitzen die Zellen Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, welche zur Erkennung Pathogen-assoziiierter molekularer Muster (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) dienen, sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, *pattern-recognition receptors*). Dazu gehören z. B. die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die in der Aktivierung von Signalwegen während der Immunantwort eine essentielle Rolle spielen [Medzhitov, 2001]. Bei den produzierten Botenstoffen handelt es sich u. a. um Zytokine. Zytokine sind von Zellen produzierte lösliche Proteine, die als Mediatoren regulatorische oder effektorische Wirkungen besitzen. Eine spezielle Gruppe dieser proinflammatorischen oder entzündungsfördernden Zytokine stellen die Chemokine dar. Diese chemotaktischen Zytokine werden u. a. von aktiven Makrophagen gebildet und dienen der Rekrutierung weiterer Zellen des Immunsystems [Dröbner & Gemsa, 2000]. Durch die verschiedenen Entzündungsmediatoren wird die Information an umliegende Zellen im Gewebe, z. B. Endothel- und Epithelzellen, weitergeleitet. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Blutgefäße. Die typischen Symptome einer Entzündung, wie Erwärmung, Rötung, Schwellung und Schmerz, werden durch einen verstärkten Blutfluss und einwandernde Zellen hervorgerufen [Janeway *et al.*, 2005]. Der Ablauf einer Entzündungsreaktion ist schematisch in Abb. 1.3 gezeigt.

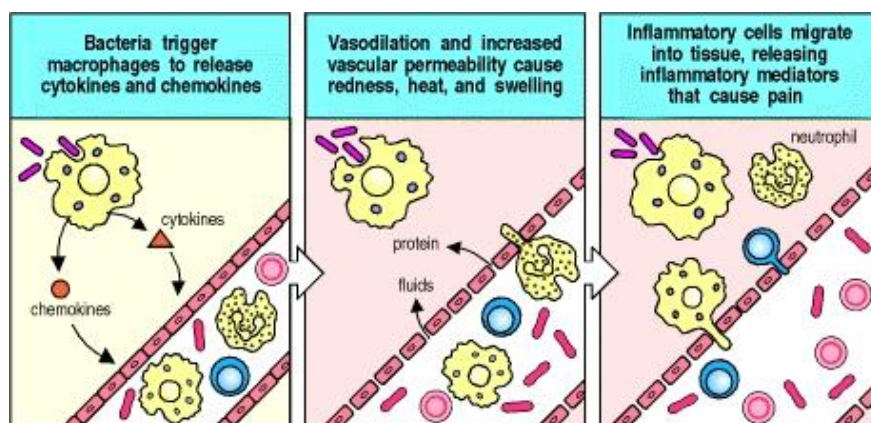


Abb. 1.3: Entzündungsreaktion nach bakterieller Infektion

Die Makrophagen werden zur Freisetzung von Botenstoffen angeregt und es kommt zu einer Erweiterung und erhöhten Durchlässigkeit der Gefäßwände. Dadurch werden wiederum Entzündungszellen angelockt, die für den entstehenden Schmerz verantwortlich sind [Janeway *et al.*, 2002].

Alle Vorgänge während einer Immunantwort werden durch intrazelluläre Signalwege gesteuert, deren Aktivierung für die Produktion der verschiedenen Botenstoffe notwendig ist. Ein Botenstoff, der besonders in Entzündungsreaktionen eine zentrale Rolle spielt, ist das Zytokin Interleukin-1 (IL-1).

Durch Bindung an den entsprechenden Rezeptor (Interleukin-1-Rezeptor, IL-1R) induziert IL-1 die Expression einer großen Zahl von proinflammatorischen Proteinen [O'Neill, 2000]. Der IL-1R und die TLRs besitzen jeweils eine intrazelluläre TIR Domäne (Toll/Interleukin-Rezeptor-Domäne), an die verschiedene Adaptorproteine mit derselben Domäne binden können [Medzhitov, 2001]. Ein Schema dazu zeigt Abbildung 1.4. Die Signalweiterleitung über Reaktionskaskaden mit verschiedenen Proteinen führt letztlich zur Aktivierung sogenannter Transkriptionsfaktoren. Der wohl wichtigste Signalweg dabei ist jener, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (nuklearer Faktor kappaB) führt.

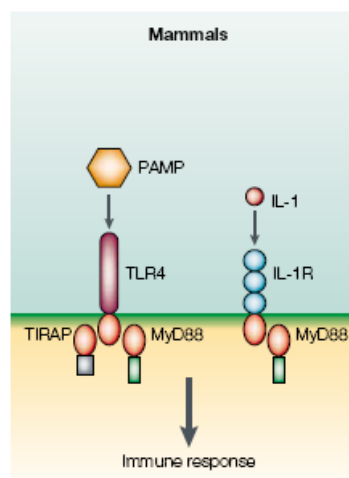


Abb. 1.4: TIR-Domänen in Rezeptoren der Immunabwehr von Säugetieren MyD88 und TIRAP (TIR-Domäne enthaltendes Adaptorprotein) sind Adaptorproteine zur Signalweiterleitung [Medzhitov, 2001].

1.4.2 Der NF- κ B Signalweg

NF- κ B ist ein in allen Zelltypen vorkommender eukaryotischer Transkriptionsfaktor, der seinen Namen der Erstbeschreibung von Sen *et al.* im Jahr 1986 verdankt [Ghos, *et al.*, 1998]. Darin wurde NF- κ B als Faktor mit DNA-Bindungsaktivität in aktivierten B-Zellen beschrieben, der für die Transkription des Gens der leichten kappa-Kette von Immunglobulin verantwortlich ist. Die Aktivität von NF- κ B geht jedoch weit über die ursprüngliche Namensgebung hinaus. Neben seiner zentralen Rolle in der Immunabwehr ist NF- κ B als regulierender Faktor an der Genexpression einer Vielzahl von Genen beteiligt. Als Antwort auf Stimuli, wie inflammatorische oder entwicklungsabhängige Botenstoffe, metabolischen und umweltbezogenen Stress oder auch Pathogen-assoziierte Substanzen, induziert er die Expression einer Fülle von Genen, die in Entzündungen, dem Zellüberleben, der Proliferation

oder der Apoptose eine wichtige Rolle spielen [Hoffmann & Baltimore, 2006] (Abb. 1.5). Des Weiteren zeigt sich die ubiquitäre Rolle von NF- κ B in intrazellulären Signalwegen durch die bei einer Fehlfunktion von NF- κ B möglichen Krankheiten, z. B. Krebs, Arthritis, chronische Entzündungen oder Sepsis [Kumar *et al.*, 2004].

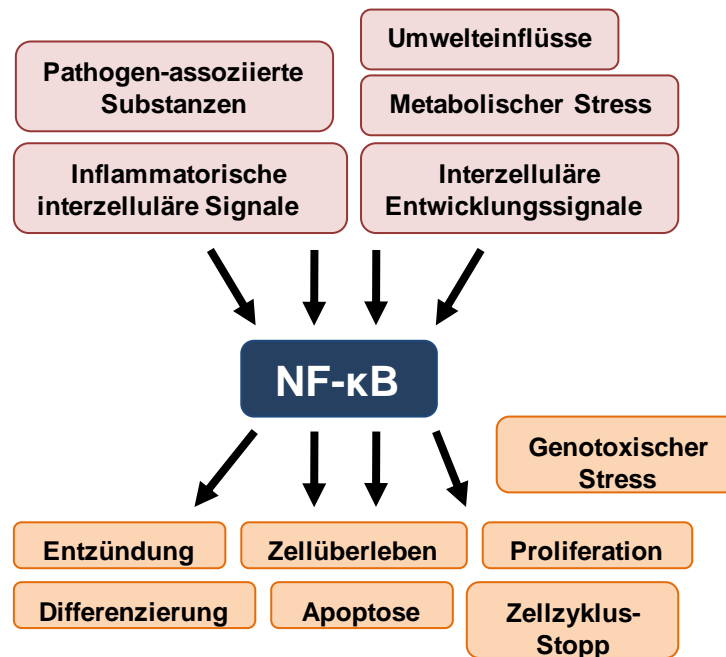


Abb. 1.5: Beteiligung von NF- κ B an zellulären Prozessen
verändert nach [Hoffman & Baltimore, 2006]

Der NF- κ B Signalweg ist zudem mit weiteren intrazellulären Signalkaskaden verknüpft, z. B. mit den durch Interferon-gamma (IFN- γ) vermittelten Reaktionen, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor STAT1 (*signal transducer and activator of transcription 1*) führen [Schroder, 2006]. Als weiterer Transkriptionsfaktor, der mit NF- κ B zusammen die Expression bestimmter Gene auslöst, gilt das Aktivator-Protein1 (AP-1). AP-1 wird durch eine weitere komplexe Signalkaskade aktiviert, in der Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) wie die p38 MAPK eine essentielle Rolle spielen [Jung *et al.*, 2002].

1.4.2.1 NF- κ B Proteine

In Säugetieren gibt es fünf Mitglieder der NF- κ B Proteinfamilie: RelA (p65), RelB, c-Rel, p50 und p52. Alle Proteine enthalten eine N-terminale Rel-Homologie-Domäne, welche für die DNA-Bindung, Dimerisierung und Assoziation mit weiteren Proteinen verantwortlich ist [Hoffmann & Baltimore, 2006]. Die Proteine p50 und p52 gehen aus den Vorläuferproteinen p105 bzw. 100 hervor. Einen Überblick über die Proteine und ihre Domänen gibt Abb. 1.6.

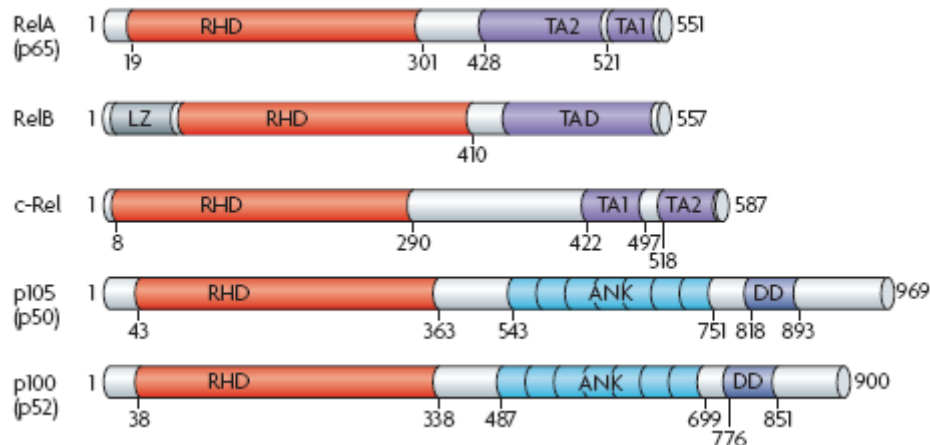


Abb. 1.6: NF-κB Proteine in Säugetierzellen

RHD = Rel-Homologie-Domäne; LZ = Leucin-Zipper-Motif; TAD = transkriptionelle Aktivierungsdomäne; ANK = Ankyrin-repeat Motif; DD = *death domain* Homologie [Perkins, 2007]

Um einen aktiven Transkriptionsfaktor zu bilden, ist eine Dimerisierung der verschiedenen NF-κB Proteine notwendig. Dabei bildet das Dimer aus p50 und RelA den klassischen Aktivator inflammatorischer Genexpression. Homo- und Heterodimeren, die nur p50 und p52 enthalten, fehlt dagegen die Transkriptions-Aktivierungsdomäne. Die Dimere RelA/RelB, c-Rel/RelB und RelB/RelB sind nicht in der Lage, an die DNA zu binden [Hoffmann & Baltimore, 2006]. Daraus ergeben sich neun funktionelle Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Spezifitäten. Im inaktiven Status liegen diese Dimere gebunden an ein weiteres Protein im Zytoplasma vor. Hierbei handelt es sich um die IκB-Proteine (Inhibitor von NF-κB), welche durch Bindung an NF-κB eine Translokation in den Zellkern inhibieren.

1.4.2.2 Der klassische NF-κB Signalweg

Der inhibitorische Komplex aus NF-κB Dimer und IκB-Protein kann durch externe Stimuli aufgelöst werden. Der kanonische oder klassische Signaltransduktionsweg, der zur Aktivierung von NF-κB führt, wird durch viele verschiedene inflammatorische Stimuli ausgelöst. Bindet ein Ligand an einen Zelloberflächenrezeptor, z. B. TLR, führt dies zur Rekrutierung weiterer Proteine an die zytoplasmatische Region des Rezeptors. Diese Adaptorproteine können dann mit dem sogenannten IKK-(IκB Kinase-) Komplex interagieren und diesen durch Phosphorylierung aktivieren. Der IKK-Komplex besteht aus verschiedenen Kinasen, die wiederum in der Lage sind, die IκB-Proteine zu phosphorylieren, und einem Gerüstprotein, NEMO (NF-κB essentieller Modulator). Die Phosphorylierung von IκB erfolgt an zwei Serin-Resten, was zu einer Degradation der IκB-Proteine durch das Proteasom führt. Das ungebundene NF-κB-Dimer kann dann in den Zellkern translozieren und die

Genexpression induzieren (Abb. 1.7) [Gilmore, 2006]. Neben dem klassischen NF- κ B Signalweg gibt es noch weitere, u. a. den nicht-kanonischen, der in der Entwicklung von B- und T-Zellorganen eine Rolle spielt, in dieser Arbeit aber nicht weiter behandelt wird [Gilmore, 2006].

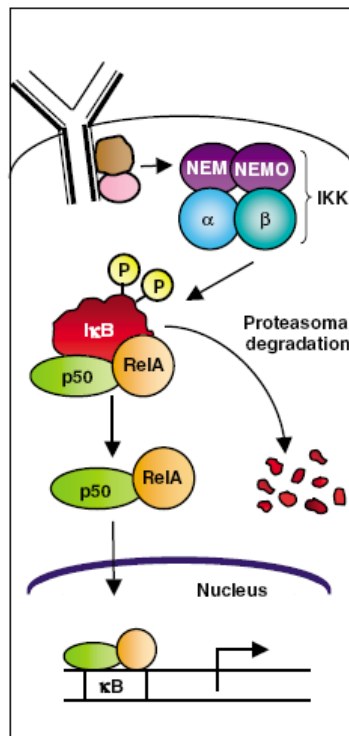


Abb. 1.7: Schema des klassischen NF- κ B Signalwegs [Gilmore, 2006]

1.4.2.3 Aktivatoren und Zielgene von NF- κ B

Die Liste der Stoffe, die in der Lage sind, den NF- κ B Signalweg zu aktivieren, ist sehr lang. Dazu gehören u. a. verschiedene Bakterien und Viren, Lipopolysaccharide (LPS), physiologischer, physikalischer sowie oxidativer Stress. Eine Hauptgruppe der aktivierenden Stimuli sind die inflammatorischen Zytokine, z. B. IL-1. Die Zielgene codieren wiederum für die verschiedensten Proteinklassen. Darunter befinden sich weitere inflammatorische Botenstoffe wie die Interleukine 6 und 8, Zelladhäsionsmoleküle, weitere Transkriptionsfaktoren und Stressantwortgene, wie die Cyclooxygenase-2 und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) [Pahl, 1999].

1.4.2.4 Inhibitoren von NF- κ B

Zu Inhibitoren des NF- κ B Signalwegs gehören u. a. Naturstoffe, Chemikalien, Metalle, Metaboliten, synthetische Substanzen, Peptide, Proteine und Antioxidantien. Die meisten dieser Inhibitoren wirken über eine Inhibierung der Phosphorylierung der I κ B-Proteine, beispielsweise die synthetische Verbindung BAY 11-7082 [Pierce *et al.*, 1997]. Aufgrund der Schlüsselrolle von NF- κ B in der inflammatorischen Antwort sind einige nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente wie Aspirin[®], Ibuprofen oder Diclofenac in der Lage, die Aktivierung von NF- κ B zu inhibieren [Gilmore & Herscovitch, 2006; Takada *et al.*, 2004]. Die Aktivierung von NF- κ B und die jeweilige zelluläre Antwort sind, wie gezeigt, sehr variabel. Durch das Vorkommen von NF- κ B in jedem Zelltyp gibt es eine zusätzliche Möglichkeit der Variation, da z. B. Makrophagen andere Funktionen ausüben müssen als Epithelzellen. Daher soll hier auf die für diese Arbeit relevanten Zelltypen und ihre Reaktionen auf eine NF- κ B Aktivierung näher eingegangen werden.

1.4.3 NF- κ B in Makrophagen

Makrophagen sind überall im Gewebe des Organismus vorkommende einkernige Zellen, deren Hauptaufgabe die Erkennung und Bekämpfung von eindringenden Pathogenen ist. Bei der Phagozytose nehmen die Makrophagen die fremden Partikel auf und bauen diese intrazellulär ab. Zusätzlich kommt es zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren [Dröbler & Gerns, 2000]. LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien und wird als Endotoxin von den Zellen des Immunsystems erkannt [Reichl, 2002]. Durch Interaktion mit dem TLR4 Rezeptor auf der Zelloberfläche wird u. a. der NF- κ B Signalweg aktiviert und es folgt die Expression der NF- κ B-abhängigen Gene [Guha & Mackman, 2001]. Darunter befindet sich z. B. der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) als inflammatorischer Mediator [Swanek *et al.*, 1999]. Eine weitere große Rolle bei der Pathogen-Bekämpfung spielt die Produktion antimikrobieller Verbindungen. Die Aktivierung eines NADPH-Oxidasekomplexes führt beispielsweise zur Produktion von toxischen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) wie dem Superoxid-Radikal (O₂⁻). Zusätzlich werden durch die NF- κ B abhängige Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) reaktive Stickstoffverbindungen (RNS, *reactive nitrogen species*) generiert [Xie *et al.*, 1994]. ROS und RNS werden dann von den Zellen in das umgebende Medium abgegeben und können mit mehreren Zielen in der mikrobiellen Zelle interagieren. Durch die Inhibition von Zink-Metalloproteinen interferieren RNS z. B. bei der DNA-Replikation [Fang, 2004]. Als wichtigster Vertreter der RNS wird in Makrophagen nach

der Aktivierung von NF- κ B Stickstoffmonoxid (NO) gebildet. Dabei katalysiert die iNOS die Synthese von NO aus L-Arginin über die Oxidation von hydroxyliertem Stickstoff, wobei neben NO auch L-Citrullin entsteht [Stuehr *et al.*, 1991] (Abb. 1.8). Die Produktion von NO nach Stimulation der Makrophagen mit LPS kann daher als Parameter für die NF- κ B Aktivierung gemessen werden [Jones *et al.*, 2007].

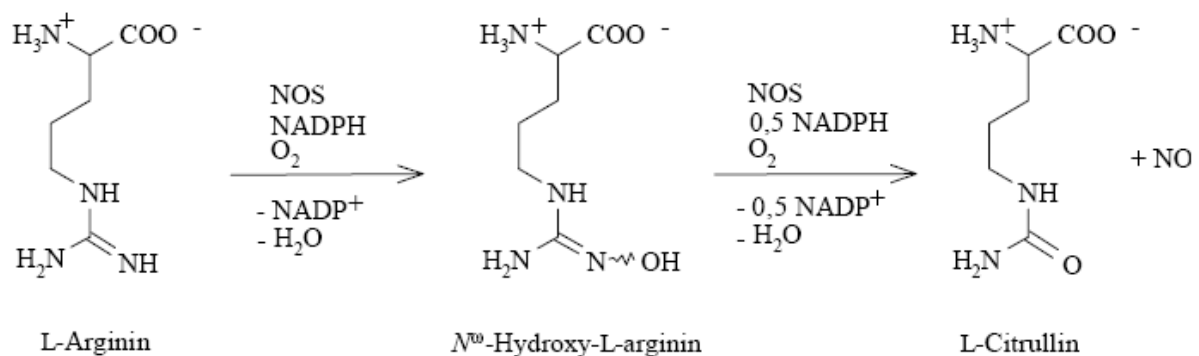


Abb. 1.8: Biosynthese von Stickstoffmonoxid [Schröder, 2007]

1.4.4 NF- κ B in Epithelzellen

Epithelzellen sind als Grenzfläche zwischen dem Körperinneren und der Umwelt die erste Kontaktfläche für eindringende Substanzen. Vor allem das Epithel der Lunge ist durch Inhalation vielen verschiedenen Reizen wie Umweltschadstoffen oder Mikroorganismen ausgesetzt. Nach Erkennung von Pathogenen induzieren die Epithelzellen eine Immunantwort, die sich hauptsächlich in der Produktion und Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden, Chemokinen und Zytokinen äußert (Abb. 1.9) [Bals & Hiemstra 2004].

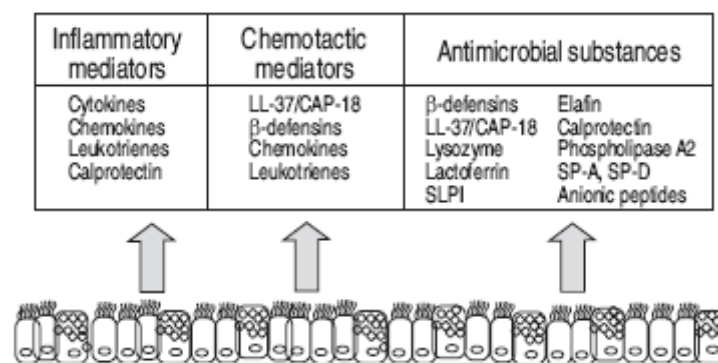


Abb. 1.9: Übersicht sekretierter Moleküle von Epithelzellen während der Immunantwort [Bals & Hiemstra, 2004]

Des Weiteren sind auch Epithelzellen in der Lage, NO als Antwort auf eindringende Pathogene zu bilden. Die Zellen müssen dafür mit inflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 beta (IL-1 β), Interferon-gamma (IFN- γ) und TNF- α stimuliert werden [Kwon & George, 1999]. Alle diese Faktoren aktivieren in den Zellen den NF- κ B Signalweg. Als Antwort auf die NF- κ B Aktivierung werden jedoch vor allem Zytokine, Chemokine und weitere Mediatoren wie das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1, das für die Rekrutierung inflammatorischer Zellen verantwortlich ist, gebildet [Holden *et al.*, 2004]. Für den Nachweis der NF- κ B Aktivierung kann in Epithelzellen nach Stimulation mit IL-1 β die Produktion des Zytokins IL-6 und des Chemokins IL-8, beides Zielgene von NF- κ B, bestimmt werden [Arnold *et al.*, 1994].

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das vermehrte Auftreten von pharmazeutischen Substanzen in der aquatischen Umwelt macht neue Tests notwendig, mit denen unerwünschte Effekte detektiert werden können. Die bestehenden Analysen mit den vorgestellten Organismen sind nicht mehr aussagekräftig genug, da hier vorwiegend endgültige Parameter wie Letalität bestimmt werden. Die Toxizität einer Substanz zeigt nicht unbedingt alle möglichen Wirkungen auf einen Organismus an. Auch kann nicht stellvertretend für alle betroffenen Lebewesen eine eingeschränkte Anzahl an Modellorganismen für Analysen herangezogen werden. Die Vielfältigkeit in der Antwort auf Umwelteinflüsse kann damit nicht erfasst werden. Kommerziell erhältliche Zelllinien aus verschiedenen Organismen und Organen können dabei neue Möglichkeiten bieten, die Analysemethoden zu erweitern. Die CALUX[®]-Systeme bieten einen ersten Ansatz, jedoch wird hier bis jetzt nur auf die Anwesenheit bestimmter Substanzen getestet. Die Wirkweisen der häufig gefundenen Pharmazeutika weichen deutlich von denen, die mit den kommerziell erhältlichen Assays nachweisbaren endokrinen Substanzen, ab. Es handelt sich dabei hauptsächlich um nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente, die z. T. in Immunsystem-gesteuerte Prozesse eingreifen. Daher müssen neue Testsysteme entwickelt werden, die es ermöglichen, Störungen dieses empfindlichen Systems anzuzeigen. Ziel dieser Arbeit ist daher die Etablierung und Analyse neuer Verfahren zum Nachweis von Wirkungen wasserrelevanter pharmazeutischer Substanzen. Dazu sollen tierische Zellkulturen verwendet und, aufgrund seiner zentralen Bedeutung für das Immunsystem, mögliche Effekte auf den NF- κ B Signalweg untersucht werden. Die Analyse erfolgte durch die Messung verschiedener Parameter, NO-Produktion von Makrophagen und Interleukin-Produktion der Epithelzellen. Zusätzlich soll ein Reportersystem entwickelt werden, das im Ansatz den CALUX[®]-Assays ähnelt. Die Herstellung stabil transfizierter Zellen, die ein von NF- κ B abhängiges Reporterprotein produzieren, soll gezielt Aufschluss über Wirkungen auf diesen Signalweg geben. Außerdem wird die Untersuchung von Wirkungen auf eine größere Zahl an NF- κ B Zielgenen mittels Genexpressionsanalyse angestrebt. Damit soll eine detailliertere Aussage zu betroffenen Genen gemacht werden können. Mit den funktionellen Testsystemen können dann Untersuchungen zu effektiven Konzentrationsbereichen der Pharmazeutika und der Wirkung von Substanzmischungen durchgeführt werden. Die Arbeit soll letztlich zu einer neuen Betrachtung und Einschätzung von Risiken durch die in der Umwelt nachweisbaren Substanzen beitragen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|----------------------------------|--|
| Blotapparatur | Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad |
| Brucheisautomat | Ziegra |
| Brutschrank | HeraCell 150i, Thermo Scientific |
| Bunsenbrenner | Fireboy eco, Integra Biosciences |
| Dampfsterilisatoren | Belimed Infection Control; Sauter 464; Zirbus HST 4-5-6 |
| Durchflusszytometer | FACS Canto mit FACS Diva 5.0 Software, BD Bioscience |
| ELISA-Mikroplattenwaschgerät | Elx50, BioTek |
| Geldokumentation | LAS3000, Fujifilm |
| Gelelektrophorese (Protein-Gele) | Criterion Cell, Bio-Rad |
| Gelkassette | Criterion empty cassette, Bio-Rad |
| Kapillarelektrophorese (RNA) | 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies |
| Magnetrührer | MR 2002, Heidolph |
| Mikroskope | CKX41/U-RFLT50, Olympus; Biozero BZ-8100, Keyence |
| Mikroskopkamera | ColorView SIS FireWire Camera 3.0 |
| Multifunktionsplattenlesegerät | Synergy TM 4, BioTek |
| Multi-Well Plattenfluorimeter | Cytofluor [®] Series 4000, PerSeptive Biosystems |
| Netzgerät | Power PAC 1000, Bio-Rad |
| PCR Cycler | T3 Thermocycler, Biometra; Mastercycler gradient, Eppendorf |
| pH-Meter | pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments |
| Pipetten | Research 0,5-10 µL / 20-200 µL / 100-1000 µL Research Mehrkanal 30-300 µL, Eppendorf; Labmate Optima 0,5-10 µL, Abimed |

| | |
|-----------------------|---|
| Pipetten | Transferpette [®] S-8 10-100 µL / Transferpette [®] -12 15-300 µL, Brand |
| Pipettierhilfen | Easypet [®] , Eppendorf; CellMate Matrix, Thermo Scientific |
| Real-Time PCR System | LightCycler [®] 480 mit Software 1.5, Roche |
| Rotoren | Ausschwingrotor A-4-44; Deepwell-Plattenrotor A- 2-DWP; Festwinkelrotor F-34-6-38 (6 x 85 mL); alle Eppendorf |
| Spektralphotometer | µQuant [™] , BioTek NanoDrop1000, Peqlab |
| Sterilwerkbank | HeraSafe KS 12, Thermo Scientific |
| Thermomixer | 5437 und comfort 5355R (mit MTP-Aufsatz), Eppendorf |
| Tiefkühlschrank -80°C | GFL |
| Vakuumpumpe | XF54 230 50, Millipore |
| Vortex | Vortex Genie 2, Scientific Industries; VF2, IKA [®] -Labortechnik |
| Waagen | PC4400, Mettler; Sartorius excellence; Analysewaage: Sartorius research |
| Wasseraufreinigung | Reinstwassersystem Milli-Q Academic A10, Millipore |
| Wasserbad | Schüttelwasserbad 3047, Köttermann |
| Wippschüttler | WS5, Edmund Bühler |
| Zählkammer | Neubauer improved, Assistant Germany |
| Zentrifugen | Biofuge fresco, Heraeus; 5804R und 5402, Eppendorf; Sprout [®] Mini-Zentrifuge, Kleinfeld Labortechnik |

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Einmalartikel für die Zellkultur wurden von den Firmen BD Falcon, Corning, Eppendorf, Greiner BioOne, Nunc, Roth, Starlab und TPP bezogen. Für die Isolierung von RNA aus tierischen Zellen wurden sterile Filterspitzen der Firma Biozym und für das Pipettieren von PCR-Ansätzen RPT-Spitzen (*repel polymer technology*) der Firma Starlab verwendet. Für ELISA-Experimente standen volumenreduzierte (*half area*) 96-Well-Platten mit einer hochbindenden (hydrophilen) Oberfläche und für Fluoreszenzanalysen schwarze 96-Well-Platten der Firma Greiner BioOne zur Verfügung. Sterilfilter der Porengröße 0,2 µm wurden von Nalgene (Bottle Top Filter 500 mL) und von Sartorius (Spritzenvorsätze Minisart) bezogen. Zur Faltenfiltration wurden Rotilabo Faltenfilter (qualitativ, 240 mm) von Roth verwendet. PVDF-Membran und Whatman-Filterpapier für die Western Blots wurden von Bio-Rad bezogen.

2.1.3 Chemikalien

| | Firma | Artikelnummer |
|---|-------------|---------------|
| 2-Mercaptoethanol | Sigma | M6250 |
| 2-Propanol | HZI Lager | - |
| 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP Liquid Substrate System) | Sigma | M3168 |
| 5(6)-Carboxyfluoresceindiacetat <i>N</i> -succinimidylester (CFSE) | Sigma/Fluka | 21888 |
| Acetylsalicylsäure | Sigma | A5376 |
| Acrylamid | Roth | 3029.1 |
| Rotiphorese [®] Gel 30 | | |
| Ammoniumpersulfat | Gibco BRL | 5523UA |
| BAY 11-7082 | Calbiochem | 196870 |
| Bezafibrat | Sigma | B7273 |
| Bicinchoninsäure (BCA) | Sigma | D8284 |
| Bromphenolblau <i>sodium salt</i> | Merck | - |
| Carbamazepin | Sigma | 4024 |
| Clofibrinsäure | Sigma | 197777 |
| Cyclophosphamid | Sigma | C0768 |
| Diclofenac <i>sodium salt</i> | Sigma | D6899 |

| | Firma | Artikelnummer |
|--|---------------------|---------------|
| Dimethylsulfoxid (<i>cell culture grade</i>) | Biozol | EMR385250 |
| di-Natriumhydrogenphosphat | Roth | P030.1 |
| di-Natriumtartrat-Dihydrat | Roth | 0254.1 |
| Ethanol, <i>pro analysi</i> | HZI Lager | - |
| Ethanol, vergällt | HZI Lager | - |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Riedel-de Haën | 27270 |
| Formalin <i>solution</i> 10 % | Sigma | HT501128 |
| Glycin | Roth | 3908.2 |
| Ibuprofen | Sigma | I4883 |
| Kaliumchlorid | Merck | 4936 |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck | 4873 |
| Kaliumhydroxid | Fluka | 60370 |
| Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat | Fluka | 61240 |
| Laemmli <i>sample buffer</i> | Bio-Rad | 161-0737 |
| Lipofectamine™ 2000 | Invitrogen | 11668-019 |
| Lipopolysaccharid aus <i>E. coli</i> | Sigma | L8274 |
| Lysozym | Boehringer Mannheim | - |
| Metafectene® PRO | Biontex | T040-0.2 |
| Methanol, <i>pro analysi</i> | HZI Lager | - |
| Methoxychlor | Sigma/Fluka | 36161 |
| Metoprolol | Sigma | M5391 |
| Milchpulver (<i>nonfat, dried</i>) | Biozol | EMR180500 |
| <i>N</i> -(1-Naphthyl)-ethylendiamin- dihydrochloride (NED) | Sigma | 9125 |
| Naproxen | Sigma | 284785 |
| Natriumbicarbonat (<i>cell culture tested</i>) | Sigma | S5761 |
| Natriumcarbonat | Riedel-de Haën | 31432 |
| Natriumchlorid | Roth | 3957.2 |
| Natriumhydrogencarbonat | Riedel-de Haën | 31437 |
| Natriumhydroxid | Roth | 6771.1 |
| Nonidet p40 | Fluka | 74385 |
| ortho-Phosphorsäure 85 % | Riedel-de Haën | 30417 |

| | Firma | Artikelnummer |
|--|--------------|----------------------|
| Phosphatase Inhibitor (PhosSTOP, cocktail tablets) | Roche | 04 906 845 001 |
| Protease Inhibitor (complete Mini, cocktail tablets) | Roche | 04 693 124 001 |
| Protein-Standard (<i>precision plus dual color</i>) | Bio-Rad | 161-0374 |
| Pyrrolidin-dithiocarbamat (PDTC) | Sigma | P8765 |
| Re-Blot Plus strong | Chemicon | 2504 |
| Rinderserumalbumin | Sigma | A7906 |
| RNase AWAY [®] | Sigma | 83931 |
| RNase-ExitusPlus [™] | AppliChem | A7153,0500 |
| Salzsäure, rauchend 37 % | Merck | - |
| Schwefelsäure 95 – 97 % | Merck | - |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) 20 % Solution | Serva | 20767 |
| Sulfamethoxazol | Sigma/Fluka | 31737 |
| Sulfanilamid | Merck | 11799 |
| TEMED | Merck | 1.10732.0010 |
| Thiazolyl Blue Tetrazoliumbromid (MTT) | Sigma | M2128 |
| Tris (TRIZMA [®] Base) | Sigma | T1503 |
| Tris-Glycin-SDS (TGS) 10x | Bio-Rad | 161-0772 |
| Tris-HCl (TRIZMA [®] hydrochlorid) | Sigma | T3253 |
| Triton X 100 | Roth | 3051.3 |
| Tween [®] 20 | Roth | 9127.1 |
| Wasser, Nuklease-frei | Ambion | AM9938 |
| WST-1 | Roche | 11644807001 |
| Zeocin [™] | InvivoGen | ant-zn-1 |

2.1.4 Kit-Systeme

| Kit | Anwendung | Firma / Artikelnummer |
|---|---|---------------------------|
| ECL [™] Advance Western Blotting Detection Kit | Western Blot Entwicklung via Chemilumineszenz | Amersham / RPN2135 |
| Human IL-6 ELISA Ready-Set-Go! [®] | Nachweis von humanem Interleukin-6 | eBioscience / 88-7066-88 |
| Human IL-8 ELISA MAX [™] Deluxe | Nachweis von humanem Interleukin-8 | BioLegend / 431505 |
| Human IL-8 ELISA Ready-Set-Go! [®] | Nachweis von humanem Interleukin-8 | eBioscience / 88-7087-88 |
| MycoAlert [®] Mycoplasma Detection Kit | Nachweis von Mycoplasmen in der Zellkultur | Lonza / LT07-218 |
| Perfectprep [®] Plasmid Midi | Isolation von Plasmid DNA | Eppendorf / 0032 005.608 |
| QIAshredder | Aufschluss von tierischen Zellen für die RNA-Isolation | Qiagen / 79654 |
| RNase-Free DNase Set | DNA-Verdau während der RNA-Isolation | Qiagen / 79254 |
| RNeasy Mini Kit | Isolation von RNA aus tierischen Zellen | Qiagen / 74104 |
| RT ² First Strand Kit | cDNA-Synthese | SABiosciences / C-03 |
| RT ² HT First Strand Kit | cDNA-Synthese (96 Proben) | SABiosciences / C-08 |
| RT ² Profiler [™] PCR Array (human): <i>custom-made</i> | Analyse von 10 ausgesuchten NF-κB verwandten Genen mittels RT-PCR im Roche LightCycler [®] 480 | SABiosciences / CAPH09923 |
| RT ² Profiler [™] PCR Array: Human NFκB Signaling Pathway | Parallele Analyse von 84 NF-κB verwandten Genen mittels RT-PCR im Roche LightCycler [®] 480 | SABiosciences / PAHS-025G |
| RT ² SYBR Green qPCR Master Mix | Master-Mix für die real-time PCR | SABiosciences / PA-010-08 |
| ToxinEraser [™] Endotoxin Removal Kit | Endotoxin-Entfernung mittels einer PolymyxinB-Säule | GenScript / L00338 |

2.1.5 Zytokine

| | Firma | Artikelnummer |
|---|-----------|---------------|
| • Recombinant Human Interferon-gamma (huIFN- γ) | ReliaTech | 100-039 |
| • Recombinant Human Interleukin-1 beta (huIL-1 β) | ReliaTech | 400-002 |
| • Recombinant Human Tumornekrosefaktor-alpha (huTNF- α) | ReliaTech | 300-028 |
| • Recombinant Murine Interferon-gamma (muIFN- γ) | ReliaTech | M10-010 |

2.1.6 Antikörper

| | Firma / Artikelnummer | Verdünnung | Anwendung |
|--|-----------------------|-----------------------------|--|
| Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG | Invitrogen / A11001 | 1:250 | FACS |
| anti-rabbit IgG, HRP-linked | CellSignaling / #7074 | 1:6666 | Western Blot |
| Anti-TNF α | Millipore / 05-168 | 5 μ g/mL – 1 μ g/mL | Neutralisation von murinem TNF- α |
| IKK α | CellSignaling / #2682 | 1:2000 | Western Blot |
| phospho-IKK α / β (Ser176/180) | CellSignaling / #2697 | 1:1000 | Western Blot |
| TLR2 (T2.5) | Santa Cruz / sc-52736 | 1:50 | FACS |
| TLR4 (purified anti-human CD284) | BioLegend / 312802 | 1:100 | FACS |

2.1.7 Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit kamen für die Transfektion von tierischen Zellen zwei verschiedene Plasmide zum Einsatz.

Für die stabile Transfektion wurde das Plasmid „pNiFty2-SEAP“ der Firma InvivoGen verwendet. Hierbei handelt es sich um ein NF- κ B-induzierbares Reporter-Plasmid mit dem Selektionsmarker Zeocin und der sekretorischen embryonischen alkalischen Phosphatase (SEAP) als Reporterprotein. Abbildung 2.1 zeigt die Vektorkarte. Das Plasmid wurde als lyophilisierter, transformierter *E. coli* Stamm bezogen, zu dessen Anzucht das mitgelieferte *E. coli* Fast-Media[®] Zeo in Pulverform für Flüssigmedium und Agar verwendet wurde.

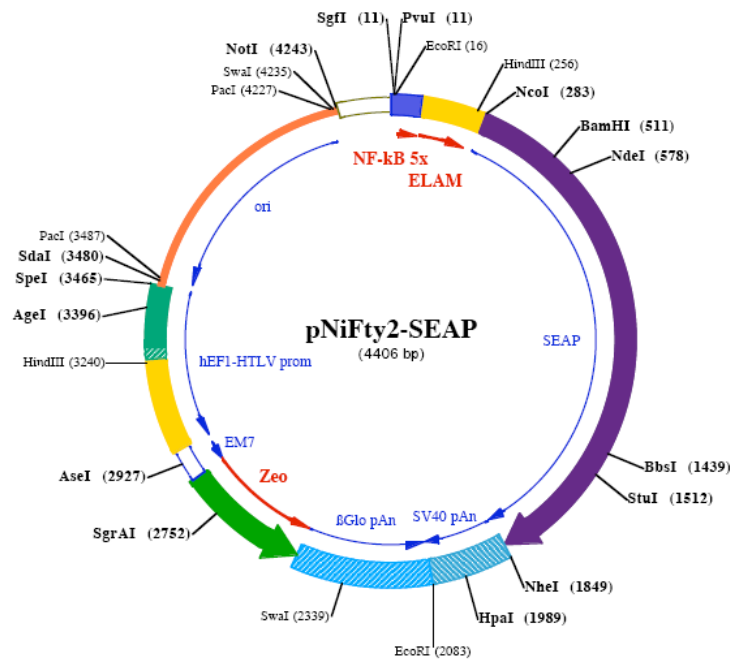


Abb. 2.1: Vektorkarte pNiFty2-SEAP von InvivoGen

Für transiente Transfektionsanalysen wurde freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe „Phagosomen Biologie“ von Dr. Maximiliano Gutierrez am HZI Braunschweig ein auf dem pEGFP-C1 Vektor basierendes Plasmid zur Verfügung gestellt. In diesem Plasmid befindet sich die Sequenz für das p65-Polypeptid (vgl. Abb. 1.6) gekoppelt an das *enhanced green fluorescent* Protein (EGFP), so dass Lokalisationsstudien möglich waren. Die Sequenz für p65 wurde über die *HindIII* und die *BamHI* Restriktionsschnittstellen in den Vektor eingefügt. Abbildung 2.2. zeigt die Vektorkarte.

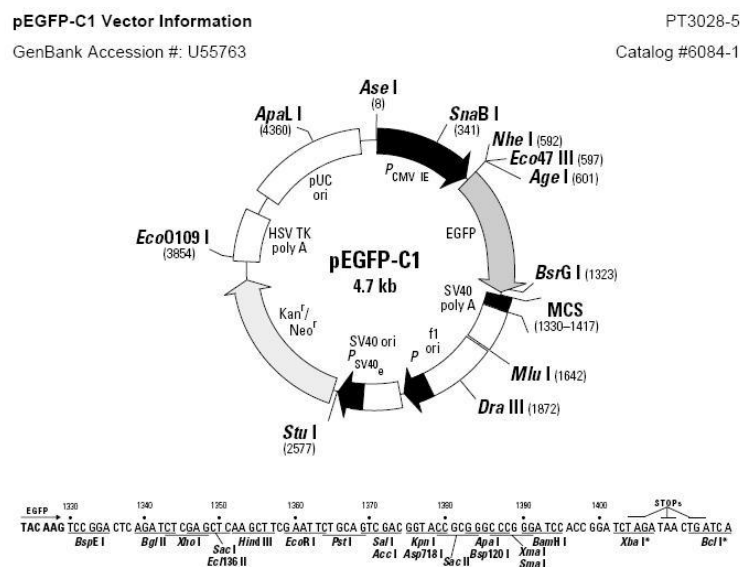


Abb. 2.2: Restriktionskarte des pEGFP-C1 Vektors

2.1.8 Puffer und Medien

| | |
|-------------------|--|
| Blotpuffer | 3,03 g/L Tris 14,4 g/L Glycin 10 % (v/v) Methanol 1,875 mL 20 % SDS-Lösung |
| ELISA Waschpuffer | 1x PBS 0,05 % Tween 20 |
| LB Medium | 10 g/L Trypton 5 g/L Yeast Extract 10 g/L NaCl pH 7 |
| Lysepuffer | 50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 0,5 % Triton X 100 0,5 % Nonidet p40 |
| PBS | 8 g/L NaCl 0,2 g/L KCl 0,24 g/L KH_2PO_4 1,42 g/L Na_2HPO_4 pH 7,4 |
| SDS-Laufpuffer | 1x TGS (Bio-Rad) |
| TBS-T | 20 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20 (frisch zugeben) pH 7,4 |

2.1.9 Medien und Lösungen für die Zellkultur

| | Firma | Artikelnummer |
|---|------------|---------------|
| Zellkulturmedien | | |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) | Lonza | BE12-741F |
| DMEM Pulver | Invitrogen | 12800-017 |
| IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium) | Lonza | BE12-722F |
| RPMI 1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) Medium | Lonza | BE12-702F |
| Einfriermedium (mit DMSO) | Invitrogen | 126448-010 |
| Serum | | |
| FBS (<i>fetal bovine serum</i>) | Lonza | 14-801F |
| FBS „GOLD“ | PAA | A15-151 |
| Sonstiges | | |
| Penicillin-Streptomycin | Invitrogen | 15070-063 |
| Trypsin-Versene [®] (EDTA) (1x) | Lonza | BE17-161E |
| Versene [®] EDTA 0,02 % | Lonza | BE17-711E |

2.1.10 Software

Für Datenanalysen sowie zur Bildbearbeitung wurden folgende Software-Anwendungen genutzt:

Microsoft[®] Office 2003 und 2007; Gen5 1.06 (BioTek); Cell[^]A 2.6 (Olympus); Adobe[®] Photoshop[®] CS3 Extended 10.0.1; BZ Viewer und BZ Analyzer (Keyence); EndNote 8.02. (Thomson). Die Auswertung der RT² Profiler[™] PCR Array Daten erfolgte mit Hilfe der Web-basierten RT-PCR-Datenanalyse von SABiosciences.

(<http://www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>)

2.2 Methoden

2.2.1 Steriles Arbeiten

Alle Arbeiten mit tierischen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Medien, Lösungen und Plastikmaterial wurden entweder steril vom Hersteller bezogen oder bei 121 °C für 20 min dampfsterilisiert. Lösungen, die für eine Dampfstерilisation nicht geeignet waren, wurden mit Filtern der Porengröße 0,2 µm steril filtriert. Glaspipetten und Erlenmeyerkolben wurden bei 180 °C für sechs Stunden trocken sterilisiert.

2.2.2 Zellzahlbestimmung

Für Experimente, in denen eine definierte Zellzahl eingesetzt werden musste, wurden die Zellen zuvor mit Hilfe einer *Neubauer improved* Zählkammer (Abb. 2.3) gezählt.

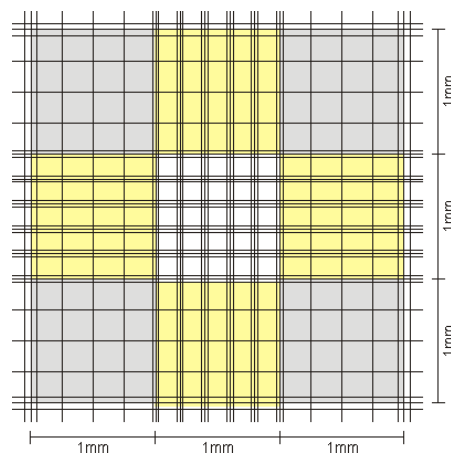


Abb. 2.3: Zählgitter einer *Neubauer improved* Zählkammer

[<http://de.academic.ru/dic.nsf/dewiki/1556822>]

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen innerhalb der vier Großquadrate (grau in Abb. 2.3) gezählt und der Mittelwert gebildet. Da sich aufgrund der Kammermaße mit aufgelegtem Deckgläschen ein Volumen von 0,1 µL pro Eckquadrat ergibt, wurde der Mittelwert mit 1×10^4 multipliziert, so dass die Zellzahl pro Milliliter bestimmt wurde. Bei zu hoher Zelldichte wurde die Zellsuspension mit PBS entsprechend verdünnt und der Verdünnungsfaktor in die Berechnung der Zellzahl einbezogen.

2.2.3 Kryokonservierung tierischer Zellkulturen

Zum Einfrieren wurde eine zu 80 % konfluente 25 cm² Zellkulturflasche einmal mit 10 mL PBS gewaschen und die Zellen in 10 mL DMEM mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 250 x g pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 mL kaltem Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach mindestens 24 h Lagerung bei -80 °C wurden die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert. Zum Reaktivieren einer Kryokonserven wurden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und sofort in 10 mL vorgewärmtem DMEM aufgenommen. Nach dem Anheften der Zellen wurde zur vollständigen Entfernung des im Einfriermedium enthaltenen DMSO ein Mediumwechsel durchgeführt.

2.2.4 Kultivierung tierischer Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in sterilen Plastikgefäßen verschiedener Größe. In Tabelle 2.1 sind die verwendeten Gefäße und deren Kulturvolumina aufgeführt.

Tab. 2.1 Zellkulturgefäße und Kulturvolumina

| Kulturgefäß | Kulturvolumen |
|-------------------------------|----------------------|
| Flasche, 75 cm ² | 30 mL |
| Flasche, 25 cm ² | 10 mL |
| Flasche, 12,5 cm ² | 5 mL |
| 6-Well-Platte | 3 mL / Well |
| 12-Well-Platte | 1 mL / Well |
| 24-Well-Platte | 0,5 mL / Well |
| 96-Well-Platte | 0,1 mL / Well |

2.2.4.1 RAW 264.7

Bei den RAW 264.7 Zellen handelt es sich um immortalisierte murine Makrophagen [Raschke *et al.*, 1978]. Die Zelllinie wurde von der „*American Type Culture Collection*“ (ATCC-TIB-71) bezogen und nach der Lieferung entsprechend des Protokolls behandelt. Die Zellen wurden in einem nassbegasteten Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ in DMEM mit 10 % FBS (DMEM-10 % FBS) kultiviert. Das FBS wurde zuvor für 20 min bei 55 °C hitzebehandelt. Nach dem Erreichen einer Konfluenz von etwa 80 % im Kulturgefäß wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurden die adhärent wachsenden Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension (5-10 % des Kulturvolumens) wurde entnommen und in ein neues Kulturgefäß überführt. Für Versuchsansätze wurden die Zellen wie unter 2.2.2 beschrieben gezählt, eine Suspension mit der gewünschten Konzentration wurde in DMEM mit 10 % FBS hergestellt und die Zellen wurden in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. In Dauerkultur wiesen die RAW 264.7 Zellen nach einiger Zeit Veränderungen in der Morphologie (z. B. häufiges Auftreten mehrkerniger Zellen) und im Verhalten (z. B. Einstellen der NO-Produktion) auf, so dass nach maximal 16 Passagen eine neue Zellkonserve reaktiviert wurde (2.2.3).

2.2.4.2 A-549

Die A-549 Zellen sind immortalisierte humane Lungenepithelzellen, die aus einem Lungenkarzinom etabliert wurden [Giard *et al.* 1973]. Die Zelllinie wurde von der „*Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*“ (DSMZ) bezogen (ACC 107) und entsprechend des Protokolls in Kultur genommen. Standardkulturmedium war auch für diese Zellen DMEM mit 10 % FBS, jedoch wurde hier als Serumzusatz FBS GOLD verwendet, welches zuvor nicht hitzebehandelt wurde. Bei FBS GOLD handelt es sich um ein standardisiertes Serum, dessen Zusammensetzung nicht Chargen-abhängig ist. Die Subkultivierung erfolgte analog zu den RAW 264.7 Zellen mittels Zellschaber und Verdünnung der Zellsuspension (5 – 10 % des Kulturvolumens). Eine Passagenzahl-abhängige Veränderung der Zellen konnte hier nicht beobachtet werden, so dass die A-549 Zellen bis zu einer Passagenzahl von 50 kultiviert werden konnten. Zur Zellzahlbestimmung wurden die A-549 Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann für 5 min mit Trypsin-EDTA Lösung (10 % des Kulturvolumens) bei 37 °C inkubiert. Bei dieser Behandlung werden die Zellen enzymatisch vom Untergrund gelöst und können so besser vereinzelt werden. Die Reaktion wurde mit der Menge des Kulturvolumens DMEM-10 % FBS abgestoppt und die Zellen wurden gezählt (2.2.2). Aus dieser Suspension wurden die

gewünschten Zellkonzentrationen in DMEM-10 % FBS hergestellt und die Zellen in entsprechenden Kulturgefäßen ausgesät. Um Hintergrund-Reaktionen zu vermeiden, wurden die Experimente zur Stimulation der A-549 Zellen in DMEM ohne FBS durchgeführt (serumfreies (SF-) DMEM).

Alle Zelllinien wurden zudem auf eine eventuelle Mycoplasmen-Kontamination untersucht. Dazu wurde ein Kit zur Detektion von Mycoplasmen verwendet und die Durchführung erfolgte laut Protokoll. Bei zweimaliger Analyse konnten keine Mycoplasmen detektiert werden.

2.2.5 Herstellung stabil transfizierter Zellen

2.2.5.1 Isolation des pNiFty2-SEAP Plasmids

Das Plasmid (2.1.7) wurde als lyophilisierter *E. coli* Stamm bezogen. Zum Reaktivieren der Bakterien wurden diese in 1 mL LB Medium gelöst. Die Bakteriensuspension wurde dann mit Hilfe einer Impföse auf einer Petrischale mit Zeocin-Agar (Fast-Media®) ausgestrichen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Zwei Erlenmeyerkolben mit je 100 mL Zeocin-Flüssigmedium (Fast-Media®) wurden mit je einer Einzelkolonie der Platte angeimpft und ÜN bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde dann mit dem PerfectPrep Plasmid Midi Kit von Eppendorf isoliert, in hochreinem Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert. Durch Bestimmung der optischen Dichte bei 260 nm konnte die Konzentration der DNA-Lösung errechnet werden, diese lag bei 0,43 µg/mL.

2.2.5.2 Zeocin-Konzentrationsreihe

Damit das Antibiotikum Zeocin als Selektionsmarker eingesetzt werden konnte, musste zunächst die Konzentration bestimmt werden, bei der Zellen ohne entsprechende Resistenz effektiv abgetötet werden. Hierzu wurden die A-549 Zellen mit verschiedenen Zeocin-Konzentrationen (0 – 1000 µg/mL) über einen Zeitraum von 8 d kultiviert. Es ergab sich hierbei für die A-549 Zellen eine effektive Konzentration von 500 µg/mL.

2.2.5.3 Transfektion der A-549 Zellen

Die Herstellung der stabilen A-549 Reporterzellen erfolgte mittels liposomaler Transfektion. Dafür wurden die A-549 Zellen 24 h vor der Transfektion in eine 24-Well-Platte mit 0,5 mL/Well und einer Zellkonzentration von 2×10^5 Zellen/mL ausgesät. Für die Transfektion mussten die kationischen Lipide des Transfektionsreagenz mit der Plasmid-DNA gemischt und zu den Zellen gegeben werden.

Diese Mischung wurde in einer 96-Well-Platte vorbereitet, indem für ein Well der 24-Well-Platte folgender Transfektionsansatz hergestellt wurde:

- A: 0,5 µg Plasmid-DNA in 30 µL PBS
- B: 2 µL Metafectene in 30 µL PBS

Lösung A wurde dann vorsichtig zu Lösung B pipettiert und für 15-20 min bei RT inkubiert, damit sich die DNA-Lipid-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurde die Mischung zu den Zellen gegeben und weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Well mit Zellen nicht transfiziert.

2.2.5.4 Selektion stabil transfizierter Zellen

48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion der transfizierten Zellen begonnen. Hierfür wurde zum Kulturmedium DMEM neben 10 % FBS zusätzlich das Antibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 500 µg/mL gegeben. Während der Selektion wurden die Zellen zweimal mit Trypsin vom Boden gelöst (2.2.4.2), jedoch im Well belassen, um somit zu gewährleisten, dass alle Zellen mit dem Antibiotikum in Berührung kommen. Nach 10 d waren die nicht transfizierten Zellen abgestorben und in den transfizierten Wells deutlich vitale Zellpopulationen zu erkennen (Abb. 2.4).

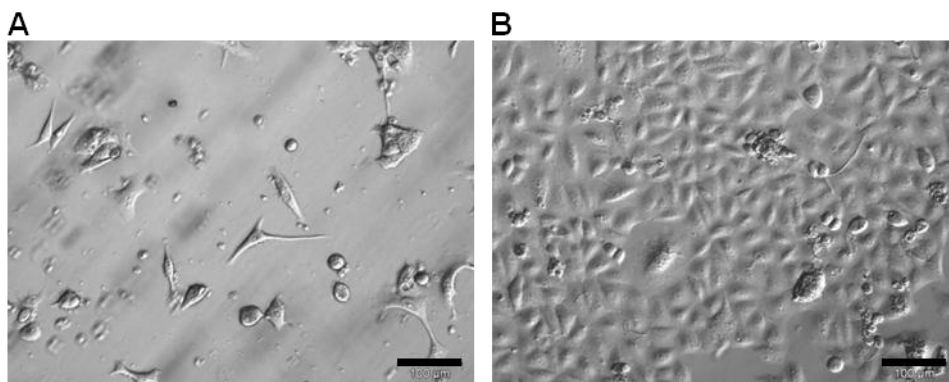


Abb. 2.4: Kontrollzellen (A) nach 10 d Kultivierung in Selektionsmedium und transfizierte Zellen (B) nach dem gleichen Zeitraum; Balken = 100 µm

Bei den erhaltenen transfizierten Zellen handelte es sich jedoch um sogenannte Mischpopulation, bei denen jede Zelle die Plasmid-Sequenz an einer anderen Stelle im Genom integriert haben könnte. Um bei Experimenten konstante Ergebnisse zu erzielen, war es daher notwendig, möglichst einen Zellklon zu verwenden, bei dem alle Zellen von einer einzigen Zelle ausgehen.

2.2.5.5 Einzelzellklonierung mittels „*Limited Dilution*“

Bei diesem Verfahren werden Einzelzellklone über eine Verdünnung der Zellsuspension erhalten. Dafür wurde die Mischpopulation trypsinisiert (2.2.4.2), gezählt (2.2.2) und es wurde eine Zellsuspension mit einer Konzentration von 50 Zellen/mL hergestellt. 100 µL dieser Suspension wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät, so dass sich theoretisch 5 Zellen in einem Well befanden. Nach einer Inkubation von 24 – 48 h wurden die 96-Well-Platten auf Zellen in den einzelnen Wells am Mikroskop überprüft und jene Wells, die eine Zelle enthielten, markiert. Nach einer Inkubation von 21 d konnten die Einzelzellklone in eine 24-Well-Platte überführt werden und nach weiteren 11 d wurde mit der Kultivierung in Zellkulturflaschen begonnen. Nach einem Funktionstest (3.2.1) wurde der Klon 1A11 (Platte1, Well A11) für alle weiteren Experimente verwendet.

2.2.5.6 Kultivierung der pNiFty A-549 Zellen (1A11)

Subkultivierung, Langzeitlagerung, Zellzahlbestimmung und Aussaat der 1A11 Zellen erfolgten analog zu den A-549 Zellen (2.2.4.2), jedoch wurde zum Standardmedium DMEM neben 10 % FBS GOLD zusätzlich Zeocin in einer Konzentration von 400 µg/mL gegeben. Diese Konzentration ist ausreichend, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Stimulationsexperimente wurden in serum- und antibiotikafreiem DMEM durchgeführt.

2.2.6 Toxizitätstests

In dieser Arbeit kamen drei unterschiedliche Toxizitätstests zum Einsatz. Mit WST-1 (2.2.6.1) wurden toxische Effekte von Substanzen auf die RAW 264.7 Zellen nach 5 d getestet, für den gleichen Test mit den A-549 Zellen wurde MTT (2.2.6.2) verwendet. Die akute Toxizität wurde parallel bei allen Experimenten mit Hilfe von CFSE (2.2.6.3) ermittelt.

2.2.6.1 WST-1

Das Tetrazoliumsalz WST-1 wird in metabolisch aktiven Zellen durch Dehydrogenasen der Atmungskette zu Formazan reduziert. Es entsteht ein wasserlösliches Produkt, dessen Absorption bei 450 nm im Photometer vermessen werden kann. Dabei korreliert die Menge an Farbstoff direkt mit der Anzahl metabolisch aktiver Zellen. Für einen 5-Tage-Toxizitätstest wurden die RAW 264.7 Zellen in einer 96-Well-Platte mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/mL ausgesät. Die zu testenden Substanzen wurden in definierten Konzentrationen hinzugegeben und es wurde eine 1:3-Verdünnungsreihe pipettiert. Als Kontrolle diente das analog verdünnte jeweilige Lösungsmittel.

Nach 5 d Inkubation wurden 10 µL WST-1 pro Well hinzugegeben. Die Messung der Absorption bei 450 nm erfolgte nach 30 min – 1 h Inkubation im Brutschrank. Die ermittelten Werte wurden prozentual auf unbehandelte Zellen (= 100 %) bezogen.

2.2.6.2 MTT

MTT ist eine gelbliche Lösung, die durch mitochondriale Dehydrogenasen lebender Zellen in ein violettes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt wird. Die Kristalle können mit Isopropanol-HCl (Isopropanol mit 0,4 % (v/v) 32 % HCl) gelöst und die Absorption bei 595 nm detektiert werden. Für den Toxizitätstest über 5 d wurden die A-549 Zellen in einer 96-Well-Platte mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/mL ausgesät und wie für die RAW 264.7 Zellen beschrieben (2.2.6.1) mit den Substanzen behandelt. Nach 5 d Inkubation wurden 20 µL MTT (5 mg/mL in PBS) pro Well zugegeben und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In den lebenden Zellen bildeten sich die Formazan-Kristalle. Die Kulturplatten wurden daraufhin für 5 min bei 3000 rpm (5804R, Eppendorf) zentrifugiert und die Überstände wurden ausgeschlagen. Zum Waschen wurden 100 µL PBS pro Well hinzugegeben und es wurde abermals zentrifugiert und die Überstände verworfen. Nach Zugabe von 100 µL Isopropanol-HCl pro Well wurde bis zum vollständigen Lösen der Kristalle auf einem Plattenschüttler bei 600 rpm inkubiert. Die entstehende violette Lösung konnte dann bei 595 nm im Photometer vermessen werden. Die ermittelten Werte wurden prozentual auf unbehandelte Zellen bezogen.

2.2.6.3 CFSE

Zur Beobachtung akut toxischer Effekte nach einem Experiment wurden die Zellen (RAW 264.7, A-549 und 1A11) nach Entnahme der Proben für die Analysen mit dem Farbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-diacetat-Succinimidylester) inkubiert. Dieser Farbstoff fluoresziert, wenn er von intrazellulären Esterasen in vitalen Zellen hydrolysiert wird. Für die Analysen wurde der Farbstoff (1 mg/mL in DMSO) 1:500 in PBS verdünnt. Nachdem restliches Medium durch Ausschlagen aus der 96-Well-Platte entfernt wurde, wurden 100 µL der CFSE-Lösung pro Well zugegeben und für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Vermessung der entstehenden Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe des Synergy4, bei einer Anregungswellenlänge von 485/20 nm und einer Emissionswellenlänge von 528/20 nm. Die erhaltenen relativen Fluoreszenzwerte (RFU, *relative fluorescence units*) wurden in Relation zu Werten unbehandelter Zellen gesetzt. Dasselbe Verfahren wurde u.a. auch für 5 d Toxizitätstests analog zum WST-Test der RAW 264.7 Zellen angewandt.

2.2.7 Indirekter Nachweis von Stickstoffmonoxid (NO)

In den RAW 264.7 Zellen wurde die NO-Konzentration als Indikator für die Bildung der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) als Zielgen des Transkriptionsfaktors NF- κ B über einen indirekten Nitrit-Nachweis mit Hilfe der Griess-Reaktion ermittelt. In wässriger Lösung reagiert das Radikal NO zu Nitrit (NO_2^-) und in geringem Maße auch zu Nitrat (NO_3^-). Das gebildete NO_2^- reagiert unter den sauren Bedingungen des Griess-Reagenz zunächst mit Sulfanilamid zu einem kationischen Zwischenprodukt, welches sich unmittelbar mit *N*-(1-Naphthyl)-ethylendiamin zu einem rot-violetten Azofarbstoff verbindet, der photometrisch vermessen werden kann [Tsikas, 2007]. Das Griess-Reagenz besteht zu gleichen Teilen aus 1 % Sulfanilamid und 0,1 % *N*-(1-Naphthyl)-ethylendiamin jeweils in 5 % Phosphorsäure (w/v).

2.2.7.1 Stimulation und Probenahme

Die RAW 264.7 Zellen wurden mit einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen/mL in 96-Well-Kulturplatten mit 100 μL Zellsuspension pro Well ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Stimulation der Zellen. Für die murinen Makrophagen ist bekannt, dass sie nach Zugabe von Lipopolysaccharid (LPS), einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, den NF- κ B Signalweg aktivieren und u. a. NO bilden [Jones *et al.*, 2007]. Daher diente LPS in allen Experimenten als Positivkontrolle, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Für Stimulationsexperimente wurden die Zellen mit definierten Konzentrationen der Substanzen bzw. Verdünnungen der Wasserproben entweder allein oder zusammen mit 100 ng/mL LPS für 18 h inkubiert. Für die Griess-Reaktion wurden 50 μL des Zellkulturüberstandes in eine volumenreduzierte 96-Well-Platte überführt.

2.2.7.2 Griess-Reaktion

Zu den Zellkulturüberständen wurden 50 μL Griess-Reagenz gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 540 nm im Photometer gemessen. Um eine Aussage über enthaltene Nitrit-Konzentrationen machen zu können, wurde parallel eine Kalibrierreihe mit definierten Konzentrationen (0 – 100 μM) Natriumnitrit (NaNO_2) in DMEM-10 % FBS angesetzt. Dann wurden 50 μL dieser Proben ebenfalls mit 50 μL Griess-Reagenz versetzt und für 10 min inkubiert. Aus den Werten dieser Standardreihe wurde mittels linearer Regression der Nitrit-Gehalt der Zellkulturüberstände bestimmt.

2.2.8 Nachweis von Zytokinen mittels ELISA

Bei den A-549 Zellen erfolgte ein Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen im Zellkulturüberstand mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunabsorptionstests, kurz als ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) bezeichnet. In dieser Arbeit wurden dafür kommerziell erhältliche Kit-Systeme verwendet, denen das Prinzip des „Sandwich-ELISA“ zugrunde liegt. Hierfür wird zunächst ein gegen das nachzuweisende Antigen gerichteter Antikörper auf der Oberfläche eines Wells einer 96-Well-Platte fixiert. Zu diesem Antikörper wird nach einer Absättigung der freien Oberfläche mit einem Blockierreagenz die Probe gegeben. Die Bindung des Antigens kann dann mit Hilfe eines Biotin-gekoppelten Detektionsantikörpers nachgewiesen werden. Dafür wird anschließend Avidin zugegeben, an welches das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden ist. Die Peroxidase katalysiert dann die Umsetzung des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) und es kommt zu einer Farbreaktion, die mit 2 N Schwefelsäure abgestoppt wird. Die Vermessung der Platte erfolgt abschließend photometrisch bei 450 nm.

2.2.8.1 Stimulation und Probenahme

Die A-549 Zellen wurden mit einer Zellkonzentration von 6×10^4 Zellen/mL in 96-Well-Kulturplatten mit 100 μ L Zellsuspension pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen den Stimulationsexperimenten unterzogen. Für die A-549 Zellen ist bekannt, dass die Aktivierung des NF- κ B Signalwegs u. a. durch den proinflammatorischen Botenstoff Interleukin-1 beta (IL-1 β) erfolgt und daraufhin inflammatorische Zytokine wie Interleukin-6 und Interleukin-8 (IL-6 bzw. IL-8) gebildet werden [Arnold *et al.*, 1994]. Daher diente IL-1 β in allen Experimenten als Positivkontrolle, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Für den Nachweis von IL-6 wurden die Zellen mit definierten Konzentrationen der Substanzen bzw. Verdünnungen der Wasserproben entweder allein oder zusammen mit 5 ng/mL IL-1 β in SF DMEM für 20 – 24 h inkubiert. Für den IL-8 Nachweis wurden die Proben nach einer Inkubationsdauer von 6 h entnommen. Die Zellkulturüberstände wurden bis zur Durchführung des ELISA in 96-Well-Platten bei -20 °C gelagert.

2.2.8.2 ELISA

Der Nachweis der Zytokine IL-6 und IL-8 erfolgte mit Kit-Systemen der Firmen eBioscience und BioLegend. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerprotokoll, es wurden jedoch volumenreduzierte 96-Well-Platten verwendet, so dass alle Volumenangaben halbiert wurden. Die mit IL-1 β behandelten Proben wurden für den Einsatz sowohl im IL-6 als auch im IL-8 ELISA 1:10 in SF DMEM verdünnt, die Proben ohne IL-1 β wurden unverdünnt eingesetzt.

Im Kit enthalten war außerdem der jeweilige Standard des Zytokins, aus dem eine Kalibrierreihe erstellt wurde, mit deren Hilfe über eine lineare Regression die Zytokinkonzentrationen in den Zellkulturüberständen ermittelt werden konnten.

2.2.9 Detektion des Reporterproteins SEAP

Die 1A11 NF- κ B Reporterzellen bilden nach Stimulation mit dem proinflammatorischen Botenstoff IL-1 β neben den physiologischen Produkten (s. A-549 Zellen 2.2.8.1) zusätzlich ein sogenanntes Reporterprotein. Die Expression dieses Gens unterliegt der Aktivierung des NF- κ B Promotors und es kommt daher nur zur Proteinsynthese, wenn der NF- κ B Signalweg aktiv ist. Als Reporterprotein diente hier die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP), die sehr einfach im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte der Nachweis über die Zugabe und Umsetzung des Substrates 4-Methylumbelliferylphosphat (MUP) durch die SEAP, wobei das fluoreszierende Methylumbelliferon entsteht.

2.2.9.1 Stimulation und Probenahme

Die 1A11 Zellen wurden mit einer Zellkonzentration von 8×10^4 Zellen/mL in 96-Well-Kulturplatten mit 100 μ L Zellsuspension pro Well ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen den Stimulationsexperimenten unterzogen. IL-1 β diente auch hier, wie bei den A-549 Zellen, als Positivkontrolle und unbehandelte Zellen als Negativkontrolle. Für den Nachweis der SEAP wurden die Zellen mit definierten Konzentrationen der Substanzen bzw. Verdünnungen der Wasserproben entweder allein oder zusammen mit 5 ng/mL IL-1 β in SF DMEM für 24 h inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden dann in eine neue 96-Well-Platte transferiert und direkt analysiert.

2.2.9.2 SEAP Nachweis mittels MUP Assay

Die Zellkulturüberstände wurden zunächst für 20 min bei 65 °C hitzebehandelt, um alle eventuell in der Probe vorhandenen Phosphatasen zu inaktivieren. Nur die SEAP bleibt aktiv nach diesem Schritt. Nach einer 2-minütigen Inkubation auf Eis zur Abkühlung der Proben, wurden je 40 μ L der Überstände in eine schwarze 96-Well-Platte transferiert. Dazu wurden 60 μ L der gebrauchsfertigen MUP-Substratlösung gegeben und es wurde für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Die entstehende Fluoreszenz wurde dann im Synergy4 bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm vermessen und die erhaltenen relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) in Relation zu der Positiv- und Negativkontrolle gesetzt.

2.2.10 Kokultivierung von Zelllinien

Für Experimente, die eine Kommunikation der Zellen über inflammatorische Botenstoffe zeigen sollten, wurden die RAW 264.7 Zellen sowohl mit den A-549 Zellen als auch mit den 1A11 Zellen zusammen kultiviert. Die Versuche erfolgten in 24-Well-Platten sowie 96-Well-Platten. Die Zellsuspensionen der einzelnen Zelllinien wurden wie für die oben beschriebenen Experimente (2.2.7, 2.2.8 und 2.2.9) hergestellt. Für die Kokultur wurde dann von der jeweiligen Zellsuspension die Hälfte des Well-Volumens eingesetzt. Die Zellzahl war somit um die Hälfte geringer als in den Versuchen mit einer Zelllinie. Stimulation, Probenahme und Analyse erfolgten analog zum Vorgehen bei den einzelnen Zelllinien.

2.2.11 Genexpressionsanalysen

Um die Menge aller DNA-Transkripte, die in Bezug zum NF- κ B Signalweg stehen, zu analysieren, wurde mit den A-549 Zellen ein RT² Profiler[™] PCR Array (Katalog-Array: *Human NF- κ B Singaling Pathway*) der Firma SABiosciences[™] durchgeführt. Mit Hilfe dieses Arrays kann die Regulation von 84 verschiedenen Genen, die direkt oder auch indirekt mit dem NF- κ B Signalweg zusammenhängen, verfolgt werden (Abb. 2.5 und 6.1.1).

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|---------|--------|---------|-----------|-----------|----------|------|---------|---------|--------|--------|
| A | AGT | AKT1 | ATF1 | BCL10 | BCL3 | CFB | BIRC2 | NOD1 | CASP1 | CASP8 | CCL2 | CD40 |
| B | CFLAR | CHUK | CSF2 | CSF3 | SLC44A2 | EDARADD | EDG2 | EGR1 | ELK1 | F2R | FADD | FASLG |
| C | FOS | GJA1 | HMOX1 | HTR2B | ICAM1 | IFNA1 | IFNB1 | IFNG | IKBKB | IKBKE | IKBKG | IL10 |
| D | IL1A | IL1B | IL1R1 | IL6 | IL8 | IRAK1 | IRAK2 | JUN | LTA | LTBR | MALT1 | MAP3K1 |
| E | MYD88 | NLRP12 | NFKB1 | NFKB2 | NFKBIA | PPM1A | RAF1 | REL | RELA | RELB | TRIM13 | RHOA |
| F | RIPK1 | SLC20A1 | STAT1 | TBK1 | TICAM2 | TLR1 | TLR2 | TLR3 | TLR4 | TLR6 | TLR7 | TLR8 |
| G | TLR9 | TMED4 | TNF | TNFAIP3 | TNFRSF10A | TNFRSF10B | TNFRSF1A | CD27 | TNFSF10 | TNFSF14 | TRADD | TICAM1 |
| H | B2M | HPRT1 | RPL13A | GAPDH | ACTB | HGDC | RTC | RTC | RTC | PPC | PPC | PPC |

Abb. 2.5: Layout des Human NF- κ B Signaling Pathway RT² Profiler[™] PCR Arrays; mit den 84 NF- κ B assoziierten Genen (A1 – G12), den Haushaltsgenen (H1 – H5) und den internen Kontrollen (H6 – H12).

Zusätzlich wurde anhand der erhaltenen Ergebnisse ebenfalls bei der Firma SABiosciences[™] ein nach Kundenwunsch entwickelter RT² PCR Array in Auftrag gegeben (Custom-Array). Hierfür wurden 10 Gene aus dem im Katalog enthaltenen Array für eine genauere Analyse ausgewählt (3.3.2 und 6.1.2). In beiden Arrays waren Haushaltsgene, deren Expression bei den verschiedenen Behandlungen konstant bleibt, sowie interne Kontrollen zur Funktionalität und Qualität des Arrays enthalten.

Das Prinzip dieser Arrays liegt im Nachweis der den Genen entsprechenden mRNA in einer Zelle nach einer bestimmten Behandlung. In dieser Arbeit wurden die A-549 Zellen mit Substanzen oder Wasserproben behandelt und anschließend die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. Die RNA wurde dann revers transkribiert, d. h. wieder in DNA (cDNA, *complementary* DNA) umgeschrieben. Hierbei wurden spezielle Primer verwendet, die spezifisch an die Polyadenylierungsstellen der mRNA binden. So wurde sichergestellt, dass nur aktive Transkripte in cDNA umgeschrieben wurden. Die cDNA wurde dann in einer sogenannten quantitativen Echtzeit-PCR (*real time* PCR, RT-PCR) eingesetzt. Bei dieser speziellen Form der PCR wird die exponentielle Zunahme der Kopienzahl der einzelnen DNA-Abschnitte über den Einbau eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR Green) während der Synthese nach jedem PCR Zyklus detektiert. Je mehr Genprodukt ursprünglich in der Probe vorhanden war, desto weniger Zyklen werden benötigt, um eine detektierbare PCR-Produktmenge zu erhalten. Die Auswertung erfolgt dann über den Vergleich der Zyklenzahlen der unterschiedlichen Proben und einer Normalisierung auf unbehandelte Zellen.

2.2.11.1 Stimulation und RNA Isolation

Für die Genexpressionsanalysen wurden die A-549 Zellen in 25 cm² Flaschen (Katalog-Array) oder in 6-Well-Platten (9,6 cm²/Well, Custom-Array) bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert und dann für 24 h mit definierten Konzentrationen der Substanzen bzw. Verdünnungen der Wasserproben entweder allein oder zusammen mit 5 ng/mL IL-1 β in SF DMEM inkubiert. Die Gesamt-RNA Isolation wurde mit dem RNeasy Mini Kit laut Protokoll zur Isolation von RNA aus tierischen Zellen durchgeführt. Die Homogenisierung des Zelllysats erfolgte mit QIAshredder-Säulen und es wurde außerdem der optionale DNase-Verdau direkt auf der RNA-Säule durchgeführt. Eine photometrische Bestimmung der Konzentration der RNA sowie eine Qualitätskontrolle mittels der NanoChip Technologie der Firma Agilent wurde am HZI im Labor der „Array Facility“ unter Leitung von Dr. Robert Geffers durchgeführt.

2.2.11.2 cDNA-Synthese und real-time PCR

Während der gesamten Durchführung wurde strikt nach den Herstellerangaben vorgegangen. Für alle Analysen wurden 0,5 μ g RNA eingesetzt. Die cDNA-Synthese für den Katalog-Array wurde mit dem Kit C-03 im Labor der „Array Facility“ durchgeführt, bei dem Custom-Array wurde das Kit C-08 verwendet und die Reaktion fand in 96-Well-Platten statt. Vor der eigentlichen cDNA-Synthese erfolgte eine Eliminierung der genomischen DNA. Dafür

wurden bei Verwendung des C-03 Kits 0,5 µg RNA mit 2 µL gDNA Elimination Puffer versetzt, mit H₂O auf 10 µL aufgefüllt und für 5 min bei 42 °C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlzeit bei 4 °C erfolgte die reverse Transkription mit den im Kit enthaltenen Komponenten. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

- 4 µL BC3 (5 x RT Buffer 3)
- 1 µL P2 (Primer & External Control Mix)
- 2 µL RE3 (RT Enzyme Mix 3)
- 3 µL H₂O

Diese 10 µL wurden dann zu der RNA-Probe gegeben und die reverse Transkription nach folgendem Programm im Thermocycler durchgeführt:

- 42 °C für 15 min
- 95 °C für 5 min, 4 °C ∞

Die cDNA-Synthese im Format der 96-Well-Platte (C-08) erfolgte abweichend vom obigen Protokoll. Hier wurden zunächst 6 µL der GE2 Lösung in die Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert und dazu wurden 8 µL RNA Probe gegeben (0,5 µg RNA plus x µL H₂O). Es erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei RT und anschließend wurden 6 µL des BC4 RT Master Mixes in jedes Well pipettiert. Das Programm für die reverse Transkription blieb hingegen gleich.

Nach beiden Reaktionen wurden die erhaltenen cDNA-Ansätze mit 91 µL H₂O verdünnt und dann in der eigentlichen *real-time* PCR eingesetzt. Für den Katalog-Array im 384-Well-Plattenformat setzte sich ein PCR-Ansatz wie folgt zusammen:

- 550 µL 2 x SABiosciences RT² qPCR Master Mix
- 102 µL verdünnter cDNA-Ansatz
- 448 µL H₂O

Dieser Mix wurde dann in die entsprechenden Vertiefungen der 384-Well-Platte mit 10 µL pro Well pipettiert. Für den Custom-Array setzte sich ein PCR-Ansatz wie folgt zusammen:

- 1 µL cDNA
- 4 µL H₂O
- 5 µL 2 x SABiosciences RT² qPCR Master Mix

Da eine Probe auf 16 Vertiefungen verteilt werden musste, wurde eine 18-fache Mischung (inkl. Pipettierreserve) vorbereitet und dann in die 384-Well-PCR-Platten pipettiert. Bis zur Analyse wurden die Platten mit Aluminiumfolie umwickelt bei -20 °C gelagert.

Die PCR erfolgte im Roche LightCycler® 480 im Labor der „Array Facility“ des HZI. Das Programm für die PCR wurde auch hier strikt nach Protokoll programmiert, wobei für den Katalog- und den Custom-Array dasselbe Programm verwendet wurde:

- “Heat Activation“: 95 °C 10 min
- “PCR Cycle” (45 Zyklen): 95 °C 15 sec; 60 °C 1 min
- “Melt Curve”: 60 °C 15 sec; kontinuierlich bis 95 °C

Die Daten wurden mit dem Programm des LightCycler® 480 über die Funktion „Abs Quant/2nd Derivative Max“ analysiert und die so erhaltenen CP (*crossing point*) Werte in eine Microsoft Office Excel Datei exportiert. Die CP Werte konnten dann direkt für die Web-basierte Datenanalyse von SABiosciences verwendet werden. Es wurde für die Daten der zwei Replikate der Behandlungen das arithmetische Mittel gebildet und CP-Werte, die > 35 lagen oder kein Signal lieferten, wurden auf 35 gesetzt (CP *cut-off*). Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die *Fold Change* Werte verwendet. Hierbei handelte es sich um die Veränderung der Expression eines Gens bei einer Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die Berechnung erfolgte nach der *delta-delta* CP Methode ($2^{-\Delta\Delta CP}$). Dabei wurde zunächst der gemittelte CP Wert der Haushaltsgene von den CP Werten der untersuchten Gene (ΔCP) subtrahiert (Normalisierung). Anschließend wurde vom ΔCP Wert der behandelten Probe der ΔCP Wert einer Kontrollbehandlung abgezogen ($\Delta\Delta CP$). Der *Fold change* oder der relative Expressionsunterschied zwischen Behandlung und Kontrolle ergab sich dann aus der Formel $2^{-\Delta\Delta CP}$.

2.2.12 SDS-PAGE und Western Blot

Um Informationen über die Aktivierung einzelner Komponenten des NF- κ B Signalwegs zu erlangen, wurden bestimmte Proteine innerhalb der Signalkaskade in den A-549 und RAW 264.7 Zellen auf Phosphorylierung untersucht.

2.2.12.1 Stimulation und Zellaufschluss

Beide Zelllinien wurden in 25 cm² Flaschen bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert und dann für die angegebenen Zeiten mit den für die jeweilige Zelllinie geeigneten aktivierenden Substanzen behandelt. Die Zellen wurden dann sofort einmal mit 10 mL eiskaltem PBS gewaschen und mit dem Zellschaber in 10 mL PBS (kalt) geerntet. Nach einer Zentrifugation von 5 min bei 5000 rpm und 4 °C (5804R, Eppendorf) wurde das Zellpellet in 50 μ L kaltem Lyse-Puffer, versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, resuspendiert, in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine

Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C (5402, Eppendorf). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Proteingehalt bestimmt.

2.2.12.2 Proteinbestimmung mittels BCA

Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der BCA Assay verwendet [Smith *et al.*, 1985]. Proteine reduzieren im alkalischen Milieu Cu^{2+} zu Cu^+ . Die Bicinchoninsäure (BCA) reagiert mit Cu^+ , wobei zwei BCA-Moleküle einen intensiv violett gefärbten Chelatkomplex mit dem Cu^+ -Ion bilden.

BCA-Reagenz A: 10 g/L BCA; 17,1 g/L Na_2CO_3 ; 1,9 g/L di-Natriumtartrat-Dihydrat; 9,5 g/L NaHCO_3 ; mit NaOH auf pH 11,25 einstellen

BCA-Reagenz B: 40 g/L $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$

Als Proteinstandard diente 10 mg/mL Lysozym in H_2O . In einer 96-Well-Platte wurden in den ersten beiden Spalten der Proteinstandard, in den Spalten 3 und 4 der Blindwert (Lysepuffer) und in den restlichen Spalten die Proben vermessen. Zunächst wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt und 100 μL dieser Lösung in alle Vertiefungen der 96-Well-Platte vorgelegt. In die erste Reihe wurden anschließend nochmals 100 μL derselben Lösung gegeben. Danach wurden 5 μL Standard bzw. Probe in die erste Reihe pipettiert, gemischt und dann jeweils 100 μL in die darunter liegenden Reihen überführt, so dass vom Standard und von den Proben eine 1:2-Verdünnungsreihe erstellt wurde. Die Platte wurde daraufhin für 30 min bei 37 °C inkubiert und dann bei 570 nm photometrisch vermessen. Für die Auswertung wurde zunächst der Blindwert von allen Proben abgezogen und dann mittels einer linearen Regression für die Werte des Standards der Proteingehalt der Zellextrakte bestimmt.

2.2.12.3 SDS-PAGE

Die Zellextrakte wurden so mit Lysepuffer verdünnt, dass in 10 μL Probe jeweils derselbe Proteingehalt vorlag. Zu dieser Proteinlösung wurden 10 μL Probenpuffer (*Laemmli sample buffer* mit 5 % 2-Mercaptoethanol) gegeben und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation konnten die Proben mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) analysiert werden, d. h. die Proteine werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, wobei das im Gel enthaltene SDS eventuelle Eigenladungen der Proteine überlagert. Es wurden fertige Gelkassetten verwendet, in denen zunächst das Trenngel und dann das Sammelgel gegossen wurden. Die Zusammensetzung für ein Gel zeigt Tabelle 2.2.

Tab. 2.2: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

| | Trenngel (12,5 % Acrylamid) | Sammelgel (4 % Acrylamid) |
|-------------------------------------|--|--------------------------------------|
| Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30) | 4,1 mL | 670 µL |
| Lower Tris (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8) | 2,5 mL | - |
| Upper Tris (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) | - | 1,25 mL |
| H ₂ O _{dest.} | 3,2 mL | 3,1 mL |
| 20 % SDS Lösung | 50 µL | 25 µL |
| 10 % APS | 50 µL | 25 µL |
| TEMED | 8 µL | 5 µL |
| 0,05 % Bromphenolblau | - | 25 µL |

Zur Taschenbildung wurde im Sammelgel ein Kamm mit 18 Zähnen verwendet. Nachdem das Sammelgel auspolymerisiert war, konnte die Kassette in die Elektrophoresekammer eingesetzt werden, welche mit 1 x TGS-Puffer gefüllt wurde. Je 20 µL der Proben wurden in die Taschen gegeben und zusätzlich wurden in einer Tasche 10 µL eines Größenstandards aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst bei einer Spannung von 80 V für ca. 45 min durchgeführt bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Anschließend wurde die Spannung auf 120 V erhöht und die Elektrophorese wurde nach weiteren 75 min gestoppt.

2.2.12.4 Western Blot

Beim „*Western Blotting*“ werden die zuvor durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wo ein Nachweis mittels Antikörpern erfolgen kann [Towbin *et al.*, 1979]. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Gel aus der Gelkassette herausgenommen und für 30 min in Blotpuffer äquilibriert. Eine PVDF-Membran und Filterpapier wurden auf die Größe des Gels zugeschnitten. Die Membran wurde zum Benetzen kurz in Methanol geschwenkt, mit Wasser gespült und ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert. Für das Blotten wurde eine Semi-Dry Blotkammer verwendet und der Blot folgendermaßen aufgebaut:

- 3 Filterpapiere in Blotpuffer einweichen und aufeinander auf die Anode legen
- PVDF-Membran auflegen
- Gel auflegen
- 3 Filterpapiere in Blotpuffer einweichen und aufeinander auf das Gel legen
- Kathode auflegen

Der Proteintransfer erfolgte bei 250 mA für 1 h. Der Blot wurde dann auseinander gebaut und die Membran für 5 min in TBS-T Puffer gewaschen.

2.2.12.5 Immundetektion

Die immobilisierten Proteine lassen sich auf der Membran mittels Antikörpern hochspezifisch nachweisen. Zum Einsatz kommen dabei gegen das Protein gerichtete Primärantikörper, welche anschließend mit Enzym-gekoppelten, polyklonalen Sekundärantikörpern detektiert werden können. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran zunächst für 1 h auf dem Wippschüttler bei RT mit 5 % Milchpulver in TBS-T Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 x 10 min mit TBST-T Puffer gewaschen und dann mit dem entsprechenden Primärantikörper (2.1.6), verdünnt in 5 % BSA in TBST-T, bei 4 °C ÜN schwenkend inkubiert. Die Membran wurde wiederum 4 x 10 min mit TBST-T Puffer gewaschen und dann mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (2.1.6), verdünnt in 5 % BSA in TBST-T, für 1 h bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde 4 x 10 min mit TBST-T Puffer gewaschen. Durch die am Sekundärantikörper gebundene Peroxidase wurde das zugegebene ECL-Reagenz umgesetzt und die entstehende Chemilumineszenz konnte mit Hilfe der LAS300 Geldokumentation detektiert werden.

2.2.12.6 Entfernen der Antikörper von der Membran

Nach einer Chemilumineszenz-Detektion ist es möglich, die Antikörper von der Membran zu entfernen (*Stripping*) und mit einem weiteren Primärantikörper zu inkubieren. Die Membran wurde dafür 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen und für 15 min bei RT mit der Stripping-Lösung auf dem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen und wie unter 2.2.12.5 beschrieben geblockt, mit Antikörpern inkubiert und mit ECL-Reagenz entwickelt.

2.2.13 Transiente Transfektion der A-549 Zellen

Für Analysen zur Translokation von NF- κ B in den Zellkern wurden die A-549 Zellen mit einem Plasmid transient transfiziert, welches die DNA-Sequenz für das NF- κ B Polypeptid p65 gekoppelt an GFP (*green fluorescent protein*) enthält (2.1.7). Die Zellen wurden dafür in spezielle Zellkulturschalen (\varnothing 35 mm, unterteilt in 4 Kompartimente, Glasboden; CELLview™ von Greiner) mit 1×10^5 Zellen/mL und 400 μ L pro Kompartiment ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit Lipofectamine™ 2000 als Transfektionsreagenz. Für einen Ansatz wurde 1 μ L der Plasmid-DNA (0,4 μ g/ μ L) mit 49 μ L SF DMEM und 0,5 μ L Lipofectamine mit 49,5 μ L SF DMEM vermischt. Anschließend wurde die DNA-Lösung zu der Lipofectamine-Lösung gegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Die DNA-Lipid-Komplexe wurden dann tropfenweise zu den Zellen, welche zuvor 300 μ L pro Kompartiment

frisches Medium erhalten hatten, pipettiert. Nach einem Tag wurden die Zellen mit 5 ng/mL IL-1 β stimuliert und nach 3 h Inkubation am digitalen Mikroskop (Keyence) fotografiert.

2.2.14 Durchflusszytometrische Analyse der A-549 Zellen

Die A-549 Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*, FACS) auf das Vorhandensein der Toll-like Rezeptoren 2 und 4 (TLR2 bzw. TLR4) auf der Zelloberfläche untersucht. Die gewünschten Proteine werden bei dieser Methode mit Hilfe von Antikörpern mit einem speziellen Fluorochrom markiert, welches im Durchflusszytometer durch ein entsprechendes Laserlicht angeregt und das emittierte Licht durch einen Photomultiplier im Gerät detektiert werden kann. Die Zellen werden dabei durch eine Kapillare angesaugt und einzeln durch den Laser abgetastet. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge an Farbstoff der Zellen, also zur Menge der hier untersuchten Rezeptoren.

Die A-549 Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert und dann für 24 h mit definierten Konzentrationen der Substanzen entweder allein oder zusammen mit 5 ng/mL IL-1 β in SF DMEM inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe von Trypsin geerntet (2.2.4.2), in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und bei 250 x g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 mL PBS mit 2 % FBS resuspendiert und wiederum zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in 900 μ L PBS mit 2 % FBS resuspendiert und je 200 μ L einer Probe auf vier 1,5 mL Reaktionsgefäße verteilt. Zwei Ansätze jeder Probe wurden bei 4 °C gelagert, zu den anderen beiden wurde der entsprechende erste Antikörper gegeben (2.1.6) und für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 2000 rpm (5402, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde 2 x mit 1 mL PBS mit 2 % FBS gewaschen und dann in 250 μ L PBS mit 2 % FBS resuspendiert. Zu diesen Proben und zu einem weiteren Ansatz ohne Erstantikörper-Behandlung wurde der zweite Antikörper (2.1.6) gegeben und für 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden dann 3 x mit 1 mL PBS mit 2 % FBS gewaschen, in 500 μ L 1 % Formalin in PBS fixiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die restlichen unbehandelten Ansätze wurden zentrifugiert und ebenfalls mit Formalin fixiert. Bis zur FACS Analyse wurden die Proben dunkel bei 4 °C gelagert. Die Analyse erfolgte im BD FACS Canto und mit der zugehörigen Software FACS Diva wurden die Daten ausgewertet.

2.3 Arbeiten mit Pharmazeutika und nativen Wasserproben

Hauptbestandteil dieser Arbeit war die Anwendung verschiedenster Substanzen sowie der Einsatz von nativen Wasserproben. Daher soll in diesem Abschnitt die Vorgehensweise, z. B. beim Lösen von Substanzen oder bei der Aufbereitung der Wasserproben, näher erläutert werden.

2.3.1 Pharmazeutika & Substanzen

Die Auswahl der Pharmazeutika wurde nach Literaturrecherchen vorgenommen [Fent *et al.*, 2006; Nikolaou *et al.*, 2007]. Es wurden daher ausschließlich pharmazeutische Substanzen gewählt, die regelmäßig in Wasseranalysen erscheinen. Von den Substanzen wurden Stammlösungen hergestellt und, da unterschiedliche Lösungsmittel verwendet wurden, zunächst Lösungsmittelkontrollen durchgeführt. Erst nachdem sichergestellt war, dass hier keine Effekte auftraten, wurden die Pharmazeutika-Lösungen in den entsprechenden Konzentrationen für Versuche verwendet. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die eingesetzten Substanzen, deren Wirkweisen und die Stammlösungen.

Tab. 2.3: Überblick über die verwendeten Pharmazeutika

| | Wirkmechanismus* | Stammlösung |
|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| Acetylsalicylsäure (Ace) | Nichtsteroidales Antiphlogistikum; Cyclooxygenasehemmung durch irreversible Acetylierung eines Serinrestes | 50 mg/mL in Ethanol <i>p.a.</i> |
| Bezafibrat (Bez) | Lipidsenker (Clofibrat-Analogen); Bindung an Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren; z. B. Aktivitätssteigerung der Lipoproteinlipase | 10 mg/mL in DMSO |
| Carbamazepin (Car) | Antiepileptikum; Blockade von vorwiegend spannungsabhängigen Natriumkanälen | 10 mg/mL in Ethanol <i>p.a.</i> |
| Clofibrinsäure (Clo) | Lipidsenker (nicht mehr im Einsatz); s. Bezafibrat | 50 mg/mL in Ethanol <i>p.a.</i> |
| Cyclophosphamid (Cyc) | Zytostatikum; Alkylierung von Nucleinsäuren; starke immunsuppressive Wirkung | 50 mg/mL in H ₂ O |

Fortsetzung Tab. 2.3

| | Wirkmechanismus* | Stammlösung |
|--|--|---------------------------------|
| Diclofenac (Dic) | Nichtsteroidales Antiphlogistikum; Cyclooxygenase-Inhibitor mit geringer Präferenz für COX-2 | 1 mg/mL in H ₂ O |
| Ibuprofen (Ibu) | Nichtsteroidales Antiphlogistikum; schwacher, nicht-selektiver Cyclooxygenasehemmer | 50 mg/mL in Ethanol <i>p.a.</i> |
| Metoprolol (Met) | β-Rezeptorenblocker; selektiver Antagonist der β ₁ -Adrenozeptoren | 50 mg/mL in H ₂ O |
| Naproxen (Nap) | Nichtsteroidales Antiphlogistikum; Cyclooxygenasehemmer (wie Ibuprofen) | 10 mg/mL in Ethanol <i>p.a.</i> |
| Sulfamethoxazol (Smx) | Sulfonamid-Antibiotikum; Hemmung der bakteriellen Folsäuresynthese durch kompetitive Verdrängung der p-Aminobenzoesäure | 50 mg/mL in DMSO |

*[Mutschler *et al.*, 2008]

Als weitere Substanz kam während der Arbeiten Methoxychlor (SL 1 mg/mL in Methanol *p.a.*) zum Einsatz. Dieses in der Landwirtschaft eingesetzte Pestizid gilt als Umweltschadstoff mit östrogenen Aktivität und steht im Verdacht, aktivierend auf den NF-κB Signalweg zu wirken [Kim *et al.*, 2005].

2.3.1.1. Herstellung eines Pharmazeutika-Mixes in DMEM

Für Analysen zum Nachweis von Effekten bei Anwendung von Substanzgemischen wurde für beide Zelllinien ein Medium angesetzt, das 9 Pharmazeutika (Ace, Bez, Car, Clo, Cyc, Dic, Ibu, Met, Nap) in einer Konzentration von jeweils 10 µg/mL enthielt. Für die A-549 Zellen wurde SF DMEM und für die RAW 264.7 Zellen DMEM-10 % FBS verwendet.

2.3.2 Native Wasserproben

2.3.2.1 Wasser aus dem Klärwerk Steinhof in Braunschweig

Im Klärwerk Steinhof in Braunschweig (Celler Heerstraße 337, 38112 Braunschweig) wurden am 06.03.2009 zwei verschiedene Wasserproben entnommen. Zunächst wurden von Mitarbeitern des Klärwerks etwa 2 L des Kläranlagenzulaufs bereitgestellt. Darauf erfolgte eine Probenahme an der Messstelle „Ablauf A Okerkanal“. Hier wurden etwa 2 L Wasser um

09:55 Uhr entnommen. Im Klärwerk werden standardmäßig verschiedene Parameter wie Phosphat oder Nitrat gemessen. Die Werte vom Tag der Probenahme zeigt Tabelle 2.4.

Tab. 2.4: Standard-Parameter der Klärwerkproben

| Parameter | Zulauf | Ablauf |
|-------------------------------|-----------|-------------|
| Ammonium (NH ₄ -N) | 47 mg/L | 32 mg/L |
| Nitrat (NO ₃ -N) | - | 3 mg/L |
| Phosphat (PO ₄ -P) | 6,8 mg/L | 0,22 mg/L |
| Leitfähigkeit | 1,2 mS/cm | 0,818 mS/cm |
| pH | 7,3 | 7,8 |

Das Ablauf-Wasser wurde einmal durch einen Faltenfilter filtriert, das Zulauf-Wasser insgesamt viermal, bevor beide Proben steril filtriert (0,2 µm) wurden. Alle Proben wurden dann bei -20 °C gelagert. Die im Zulauf enthaltenen Feststoffe (12,5 g) wurden mit 100 mL Methanol *p.a.* versetzt und 2 h bei RT gerührt. Dann wurde die Probe mittels Faltenfilter filtriert und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Vor dem Einsatz in der Zellkultur wurden alle Proben nochmals steril filtriert (0,2 µm) und aliquotiert. Zusätzlich wurden etwa 300 mL Zulauf- und Ablaufwasser zur Analyse der enthaltenen Pharmazeutika verwendet. Diese erfolgte durch U. Kunkel in Bayreuth mittels Festphasenextraktion und anschließender HPLC-MSMS. Das Ergebnis der Analyse zeigt Tabelle 2.5.

Tab. 2.5: Pharmazeutika-Konzentrationen Zulauf- und Ablauf-Wasser

| Substanz [ng/L] | Zulauf | Ablauf |
|-----------------|--------|--------|
| Primidon | 390 | 320 |
| Sulfamethoxazol | 551 | 715 |
| Propranolol | 48 | 14 |
| Clofibrinsäure | 59 | 69 |
| Bezafibrat | 1818 | 313 |
| Naproxen | 1527 | 117 |
| Diclofenac | 1267 | 1165 |
| Ibuprofen | 10129 | 164 |
| Metoprolol | 5515 | 1859 |
| Ketoprofen | 439 | n. q. |
| Gemfibrozil | 286 | 86 |

n. q. = nicht quantifizierbar

Zudem wurde in den Wasserproben der gesamte gelöste organische Kohlenstoff (DOC) detektiert. Dieser lag im Zulauf-Wasser bei 40 mg/L und im Ablauf-Wasser bei 14 mg/L. Die Wasser-Proben wurden in Experimenten ab einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt, d. h., dass das Kulturmedium aus bis zu 50 % des zu untersuchenden Wassers bestand und das Medium entsprechend verdünnt war. Um eventuell daraus resultierende Stress-bedingte oder auch Matrix-bedingte Effekte auf die Zellen auszuschließen, wurde außerdem mit diesem Wasser das Standardmedium DMEM angesetzt. Dafür wurde das Medium in Pulverform bezogen und laut Herstellerangaben 500 mL DMEM hergestellt. Die Pufferung erfolgte über die Zugabe von Natriumhydrogencarbonat. Das Medium wurde dann steril filtriert und mit 10 % FBS (hitzebehandelt) versetzt. Als Kontrolle wurden 500 mL DMEM aus destilliertem Wasser ($\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$) hergestellt. Das Medium wurde sowohl unverdünnt als auch in verschiedenen Verdünnungen verwendet. Für alle Experimente mit Wasserproben diente zusätzlich steril filtriertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ab einer Verdünnung von 1:2 als Kontrolle.

Das Zulauf-Wasser wurde nach ersten Experimenten einer Entfernung aller enthaltenen Endotoxine unterzogen. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Kit verwendet, das mit Hilfe einer PolymyxinB-Säule Endotoxine aus der Probe entfernt. Die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Das so erhaltene endotoxin-freie Zulauf-Wasser wurde steril filtriert und bei -20 °C gelagert. In Experimenten wurden auch hier Verdünnungen ab 1:2 eingesetzt.

2.3.2.2 Roter Main

Die Wasserproben aus dem Roten Main bei Bayreuth wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dipl.-Geoökol. Uwe Kunkel aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Radke, Lehrstuhl für Hydrologie an der Universität Bayreuth. Die Proben wurden am 05.08.2008 um 18:20 Uhr etwa 1 km unterhalb des Auslaufs einer Kläranlage zwischen Bayreuth und Heinersreuth entnommen. Nach Eintreffen der Probe wurde diese steril filtriert (0,2 µm), aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Eine Analyse der enthaltenen Pharmazeutika erfolgte durch U. Kunkel in Bayreuth mittels Festphasenextraktion und anschließender HPLC-MSMS. Das Ergebnis dieser Analyse zeigt Tabelle 2.6.

Tab. 2.6: Pharmazeutika-Konzentrationen Roter Main

| Substanz | Konzentration |
|-----------------|----------------------|
| Bezafibrat | 55 ng/L |
| Clofibrinsäure | 10 ng/L |
| Diclofenac | 315 ng/L |
| Naproxen | 30 ng/L |
| Sulfamethoxazol | 115 ng/L |

Vermutet wurden in der Probe zusätzlich noch Ibuprofen, Ketoprofen und Metoprolol, jedoch wurden hier keine aussagekräftigen Daten erhalten (Mitteilung durch U. Kunkel). Das Main-Wasser wurde in Experimenten ab einer Verdünnung von 1:2 eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Beeinträchtigung der physiologischen Zellfunktion

3.1.1 Funktionsanalyse der verwendeten Zelllinien

Die ausgewählten Zelllinien RAW 264.7 und A-549 wurden zunächst auf ihre physiologischen Funktionen in Bezug auf den NF- κ B Signalweg überprüft. Dabei musste getestet werden, ob die Zellen auf die verwendeten Stimulanzien mit einer Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade reagieren. Bei den eingesetzten Substanzen zur Stimulation handelte es sich im Falle der RAW 264.7 Makrophagen um Lipopolysaccharid (LPS). Dieses kam bereits in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe in einer Konzentration von 100 ng/mL zum Einsatz und zeigte in Konzentrationen > 100 ng/mL toxische Effekte [Lüderitz, 2008; Klippel, 2009]. Die A-549 Epithelzellen wurden mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β stimuliert. Die in der Literatur im Zusammenhang mit A-549 Zellen angewandten IL-1 β -Konzentrationen variieren im Bereich von 1 ng/mL bis 100 ng/mL [Holden *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2001]. In dieser Arbeit wurde für Western Blot Analysen zunächst mit 10 ng/mL IL-1 β gearbeitet, für alle weiteren Experimente mit den A-549 Zellen kamen 5 ng/mL IL-1 β zum Einsatz [Chen *et al.*, 2006]. Zum Nachweis der Aktivierung des NF- κ B Signalwegs wurde ein Western Blot (2.2.12) durchgeführt, mit welchem die Phosphorylierung des IKK-Proteins (1.3.1) gezeigt werden konnte (Abb. 3.1).

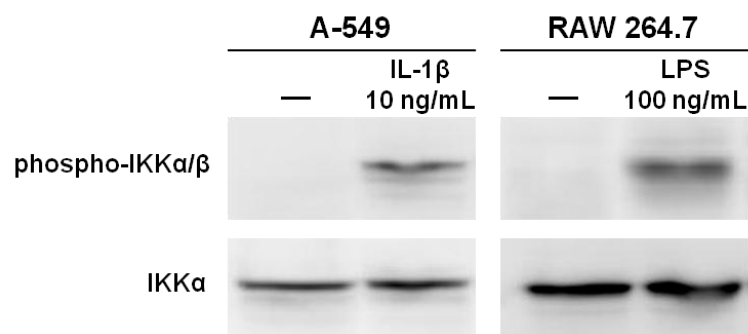


Abb. 3.1: NF- κ B Aktivierung in A-549 und RAW 264.7 Zellen durch IL-1 β bzw. LPS Die Zellen wurden für 10 min (A-549) bzw. 30 min (RAW 264.7) mit den angegebenen Substanzen stimuliert. Als Kontrolle für den gleichmäßigen Proteinauftrag diente die Inkubation mit einem IKK α Antikörper nach dem *Stripping* der Membran.

In beiden Zelllinien wurde der Signalweg nach der Behandlung mit den jeweiligen Stimulanzen aktiviert. Es wurden nach 10 min und 30 min Stimulation der Zellen Proben genommen. In den A-549 Zellen konnte bereits nach 10 min Behandlung mit IL-1 β eine Phosphorylierung der IKK nachgewiesen werden, die aufgrund des schnellen Reaktionsablaufs und der Reversibilität nach 30 min nur noch sehr schwach bis gar nicht mehr zu verzeichnen war (Daten nicht gezeigt). Umgekehrt zeigten die RAW 264.7 Zellen erst nach 30 min eine deutliche IKK-Phosphorylierung.

Die direkte Beteiligung von NF- κ B an der durch die IL-1 β Behandlung ausgelösten Signalkaskade wurde für die A-549 Zellen zusätzlich mittels Kerntranslokationsstudien nachgewiesen. Dazu wurden die Zellen mit einem Plasmid, welches für ein Fusionsprotein aus p65 (s. Abb. 1.6) und dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) codiert, transient transfiziert (2.2.13) und 3 h nach Stimulanzzugabe (5 ng/mL IL-1 β) fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 3.2).

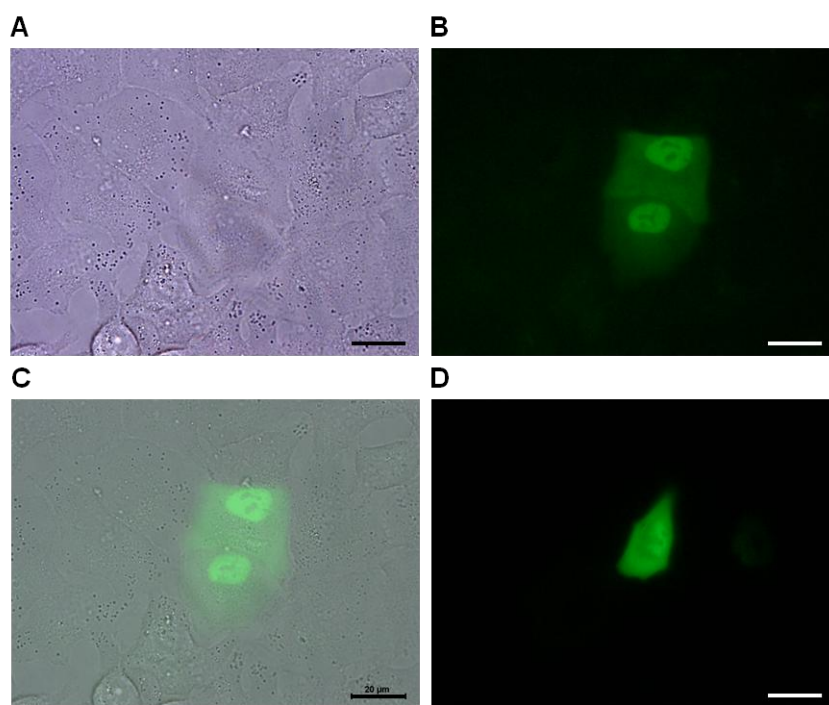


Abb. 3.2: Translokation des p65-Proteins in A-549 Zellen

Die transient transfizierten Zellen wurden für 3 h mit 5 ng/mL IL-1 β stimuliert. (A) Hellfeld, (B) GFP, (C) Overlay A+B, (D) Beispiel einer unbehandelten Kontrollzelle; Balken = 20 μ m

Das GFP-Signal war nach der Stimulation überwiegend im Zellkern zu detektieren, während nicht stimulierte Zellen eine diffuse Verteilung des Fusionsproteins im Zytoplasma zeigten.

Im Folgenden wurde geprüft, über welche physiologischen Parameter die NF- κ B-Aktivierung der Zellen gemessen werden kann. Die RAW 264.7 Makrophagen produzieren als Antwort auf eine Stimulation mit LPS unter anderem die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), welche die Bildung von NO aus L-Arginin katalysiert. [Miller *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2007]. Der Nachweis des gebildeten Stickstoffmonoxids erfolgte indirekt über die Bestimmung des Nitritgehalts im Medium mit Hilfe der Griess-Reaktion (2.2.7). Die A-549 Zellen produzieren nach Stimulation mit IL-1 β weitere inflammatorische Botenstoffe, wie das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) und das Chemokin Interleukin-8 (IL-8) [Arnold *et al.*, 1994; Newton *et al.*, 2007]. Diese wurden für die vorliegende Arbeit ausgewählt, da der Nachweis über einen Immunassay (ELISA, 2.2.8) einfach durchführbar und zudem sehr sensitiv ist. Eine zusätzliche Validierung dieser Systeme erfolgte durch den Einsatz eines kommerziell erhältlichen NF- κ B Inhibitors. Bei BAY 11-7082 handelt es sich um eine synthetische Substanz, die laut Herstellerangaben inhibierend auf die Phosphorylierung der I κ B-Proteine wirkt. Die Ergebnisse eines 5 d MTT-Toxizitätstest (2.2.6.2) zeigten, dass eine Konzentration von 1 μ g/mL die Vitalität der Zellen um etwa 80 % reduziert. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse des Toxizitätstests exemplarisch für die A-549 Zellen. Bei den RAW 264.7 Zellen war die Konzentrationsabhängigkeit ähnlich (Daten nicht gezeigt).

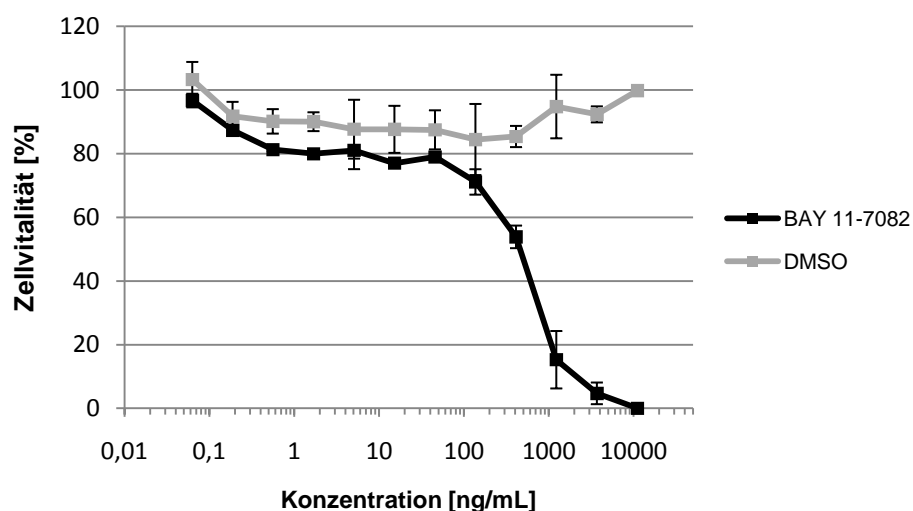


Abb. 3.3: 5-Tage MTT-Test für BAY 11-7082 in den A-549 Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (3 Replikate) bezogen auf unbehandelte Zellen (= 100 %).

Die Stimulationsexperimente für die RAW 264.7 und die A-549 Zellen erfolgten wie in den Kapiteln 2.2.7 bzw. 2.2.8 beschrieben. BAY 11-7082 wurde mit einer Konzentration von 1 μ g/mL in allen weiteren Experimenten eingesetzt, da die parallel mittels CFSE

durchgeführten Tests auf Vitalität in den Versuchen mit einer Inkubationsdauer von 18 - 24 h keinen toxischen Effekt für den Inhibitor zeigten. Für eine Inhibition der gemessenen Parameter erwies sich diese Konzentration daher als geeignet. Das Ergebnis für die NO-Produktion der Makrophagen zeigt Abb. 3.4. Die Zellen produzierten nach Stimulation mit LPS durchschnittlich 40 μM Natriumnitrit. Bei Anwendung des NF- κB Inhibitors zeigte sich ein Rückgang der NO-Produktion und der damit verbundenen Menge an Natriumnitrit um etwa 50 %. Unbehandelte Zellen sind Zellen, die nur mit dem Kulturmedium (DMEM-10 % FBS) inkubiert wurden und somit als Kontrolle dienten.

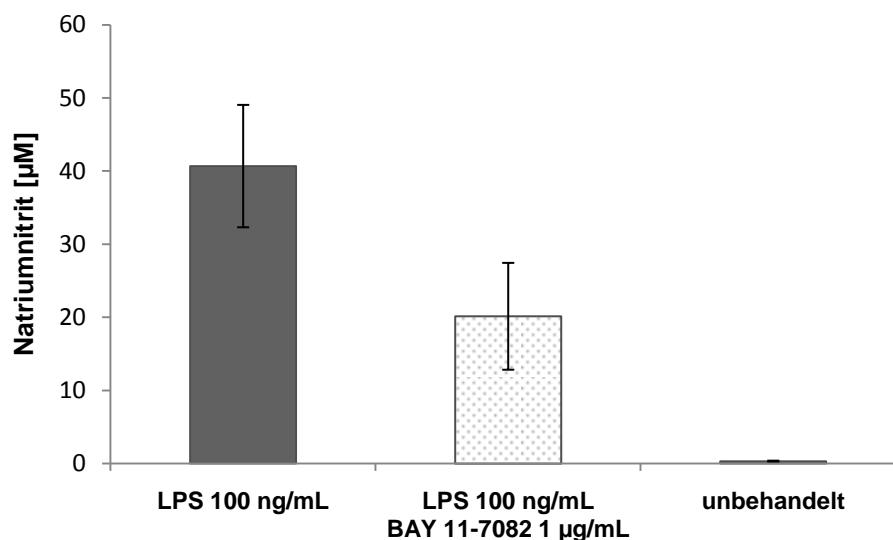


Abb. 3.4: NO-Produktion in RAW 264.7 Zellen

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten.

Analog zeigt Abb. 3.5 die Interleukin-Produktion der Epithelzellen nach Stimulation mit IL-1 β . Bei den Kontrollzellen handelte es sich hierbei um nur mit serumfreiem (SF-) DMEM inkubierte Zellen. Die A-549 Zellen produzierten nach 21 h Stimulation 600 pg/mL IL-6. Der Inhibitor zeigte einen Rückgang auf 400 pg/mL IL-6. Im Gegensatz dazu ließen sich bereits nach einer IL-1 β Inkubationsdauer von 6 h im Überstand der A-549 Zellen hohe IL-8 Konzentrationen nachweisen (2500 pg/mL). Die Inhibition der Antwort durch BAY 11-7082 war gering und zeigte keine Signifikanz, was auf weitere Regulationsmechanismen der IL-8 Produktion schließen lässt. Tatsächlich ist bekannt, dass die Ausschüttung von IL-8 nicht nur auf Ebene der NF- κB abhängigen Signaltransduktionskaskaden sondern auch auf Ebene der mRNA-Stabilität reguliert werden kann [Winzen *et al.*, 1999]. Dadurch ergibt sich eine schnellere und auch mit dem spezifischen NF- κB abhängigen Inhibitor nicht zu reduzierende Reaktion als für die IL-6 Produktion.

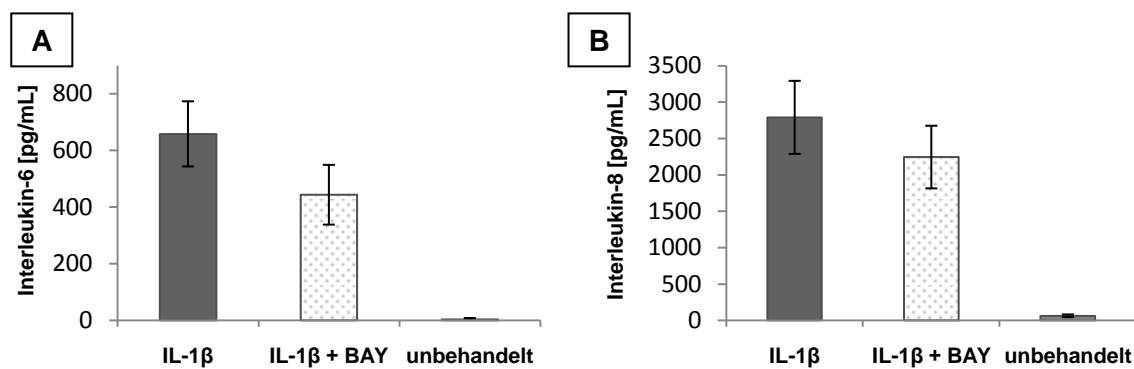


Abb. 3.5: Zytokin-Produktion der A-549 Zellen

(A) Interleukin-6 (B) Interleukin-8; Konzentrationen: 5 ng/mL IL-1 β , 1 μ g/mL BAY 11-7082. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 4 Replikaten.

Um im Folgenden eine einheitliche Darstellung zu verwenden, werden alle erhaltenen Daten jeweils auf die zugehörige Positivkontrolle (Stimulation mit LPS bzw. IL-1 β = 100 %) normiert und prozentual dargestellt. Auf eine Darstellung der in allen Fällen sehr geringen Werte der Negativkontrolle (= unbehandelte Zellen) wird verzichtet.

3.1.2 Analyse der Wirkung verschiedener Pharmazeutika

3.1.2.1 Toxizität

Die ausgewählten Pharmazeutika (Tab. 2.4) wurden zunächst auf ihre Toxizität getestet. Exemplarisch sollen hier die Ergebnisse der 5 d Toxizitätstests von Diclofenac und Ibuprofen vorgestellt werden. Für die RAW 264.7 Zellen wurde ein WST- und parallel ein CFSE-Test und für die A-549 Zellen ein MTT-Test durchgeführt (2.2.6.1-3). Alle drei Substanzen zeigen die metabolische Aktivität der Zellen an. Während WST und MTT die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen anzeigen, bindet CFSE irreversibel an Zellproteine und beginnt zu fluoreszieren, wenn es durch intrazelluläre Esterasen hydrolysiert wird. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen, die Lösungsmittel wurden in der gleichen Menge wie bei den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt. Die Ergebnisse für die RAW 264.7 Zellen mit WST wiesen neben hohen Schwankungen auch Werte auf, die weit über denen der unbehandelten Zellen lagen und zeigten für Diclofenac ab 80 μ g/mL und für Ibuprofen ab 200 μ g/mL toxische Effekte (Abb. 3.6). Diese Effekte wurden wiederholt bei der Anwendung von WST beobachtet, so dass zusätzlich der CFSE-Test durchgeführt wurde, der bei geringeren Standardabweichungen eine Toxizität ab 50 μ g/mL für Diclofenac und ab 200 μ g/mL für Ibuprofen zeigte (Abb. 3.7). Die Ursache für die hohen und schwankenden

Werte im WST-Test konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse der MTT-Tests für die A-549 Zellen zeigt Abb. 3.8. Auch hier wurden bei Konzentrationen größer als 50 $\mu\text{g/mL}$ (Diclofenac) und 200 $\mu\text{g/mL}$ (Ibuprofen) toxische Effekte beobachtet. Die Werte für Ibuprofen korrelierten in beiden Zelllinien größtenteils mit denen des Lösungsmittels Ethanol, so dass hier keine direkte Aussage über die Toxizität von Ibuprofen möglich war. Für Diclofenac, welches in Wasser gelöst wurde, war dies nicht der Fall.

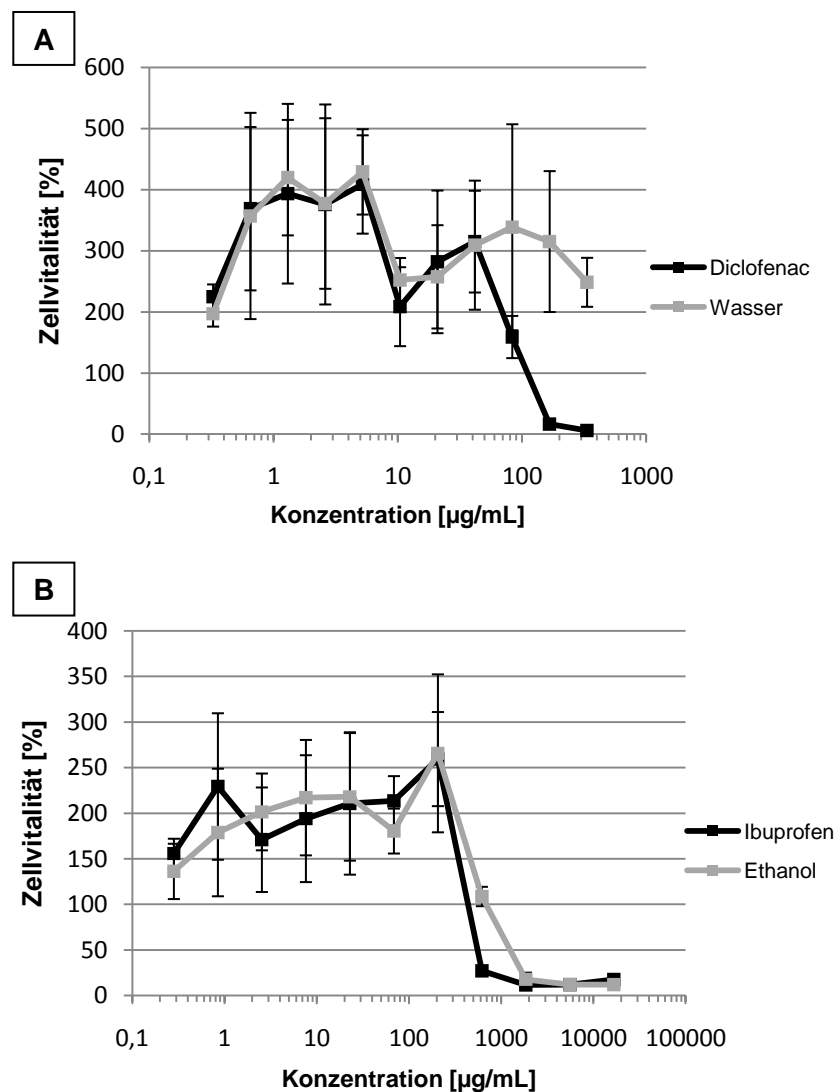


Abb. 3.6: WST-Tests mit den RAW 264.7 Zellen

(A) Diclofenac (B) Ibuprofen; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (3 Replikate) bezogen auf unbehandelte Zellen (= 100 %).

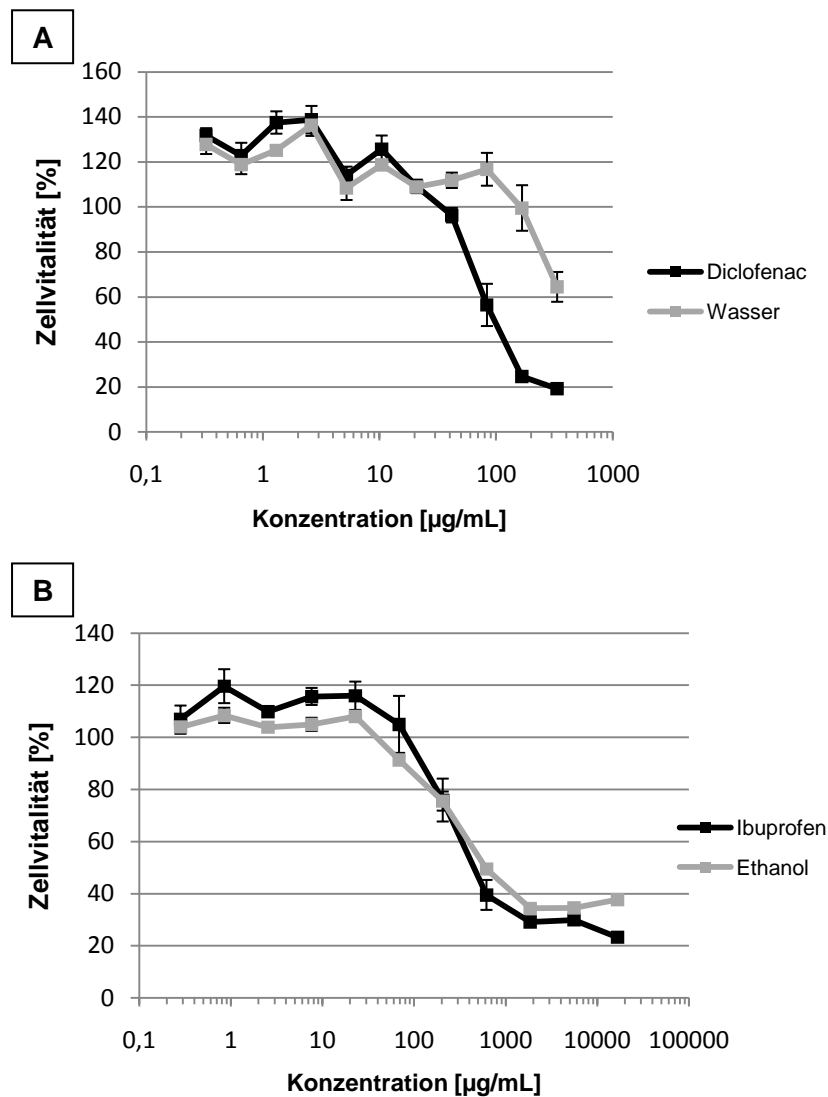


Abb. 3.7: CFSE-Tests mit den RAW 264.7 Zellen

(A) Diclofenac (B) Ibuprofen; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (3 Replikate) bezogen auf unbehandelte Zellen (= 100 %).

Die mit den 5 d Toxizitätstests erhaltenen Ergebnisse wurden zur Orientierung für die in den Experimenten eingesetzten Konzentrationen herangezogen. Es wurde jedoch zu jedem Experiment parallel ein Test mit CFSE durchgeführt, so dass der Einfluss akut-toxischer Effekte der Pharmazeutika auf die jeweiligen Parameter ausgeschlossen werden konnte.

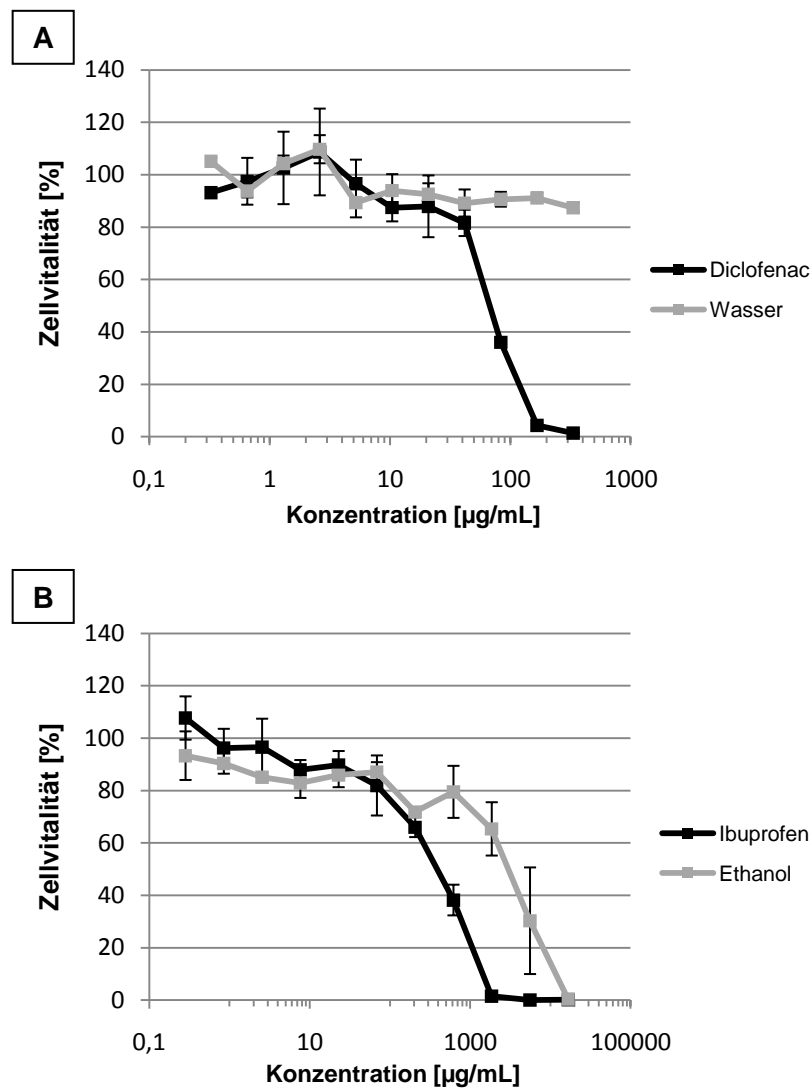


Abb. 3.8: MTT-Tests mit den A-549 Zellen

(A) Diclofenac (B) Ibuprofen; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung (3 Replikate) bezogen auf unbehandelte Zellen (= 100 %).

Für alle anderen Pharmazeutika wurden ebenfalls Toxizitätstests (CFSE, MTT) durchgeführt, um den nicht toxischen Konzentrationsbereich zu ermitteln (Daten nicht gezeigt). Dieser Bereich war abhängig vom jeweiligen Lösungsmittel und der Substanz, so dass in den Experimenten nicht mit identischen Konzentrationen für alle Pharmazeutika gearbeitet werden konnte. Für die Interpretation der Daten der weiterführenden Experimente waren dann jedoch die parallel ermittelten CFSE-Werte relevant, da auch Konzentrationen oberhalb der toxischen Werte des 5 d Tests eingesetzt wurden. Die Daten der CFSE-Tests werden, wenn nötig, mit angegeben. Wurde kein toxischer Effekt der Substanzen auf die Zellen während der Inkubationszeit des Experiments beobachtet, wird auf eine Erwähnung verzichtet.

3.1.2.2 Stickstoffmonoxid-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen

Die Effekte der verschiedenen Pharmazeutika auf die NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen wurden wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben analysiert. Die Zellen wurden jeweils mit LPS und der entsprechenden Substanz inkubiert und mit Hilfe der Griess-Reaktion wurde die NO-Produktion detektiert. Dabei wurden auch Experimente mit den Pharmazeutika allein, ohne das Stimulanz LPS, durchgeführt, es zeigten sich jedoch für alle Substanzen keine Effekte (Daten nicht gezeigt). Die Abbildungen 3.9 bis 3.11 zeigen die Effekte der ausgewählten Pharmazeutika auf die NO-Produktion der Makrophagen.

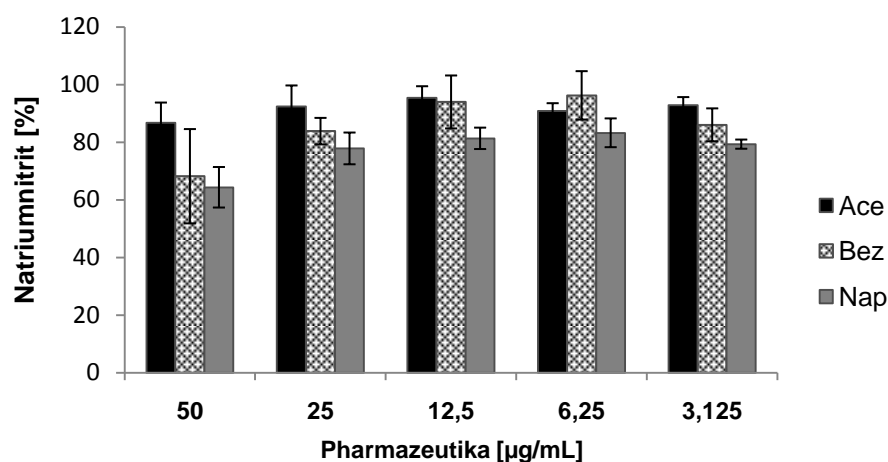


Abb. 3.9: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Acetylsalicylsäure (Ace), Bezafibrat (Bez) oder Naproxen (Nap) behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 (Ace, Bez) oder 2 (Nap) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Die Behandlungen mit Acetylsalicylsäure, Bezafibrat, Naproxen, Cyclophosphamid und Metoprolol zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die NO-Produktion der RAW 264.7 Zellen. Die Anwendung von Carbamazepin hingegen führte in den beiden höchsten Konzentrationen (250 µg/mL und 125 µg/mL) zu einem deutlichen Rückgang der NO-Produktion (Abb. 3.10). Dieser Effekt konnte nicht mit einer akuten Toxizität korreliert werden (s. Tab. 3.1).

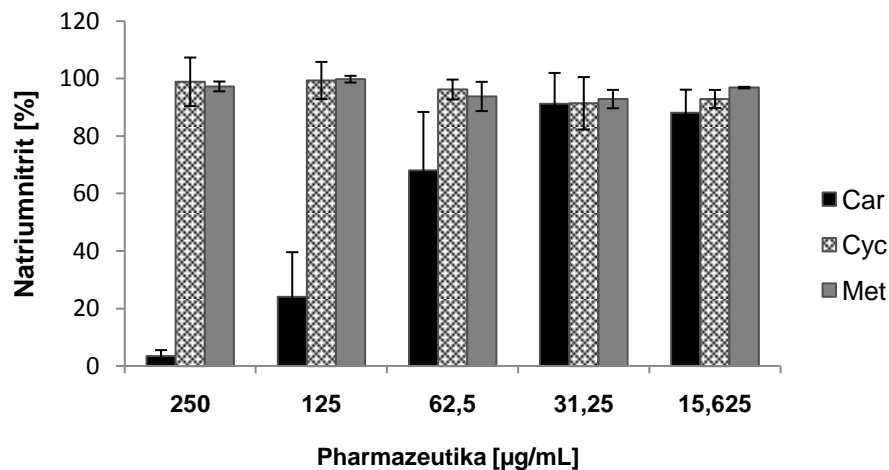


Abb. 3.10: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Carbamazepin (Car), Cyclophosphamid (Cyc) oder Metoprolol (Met) behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 (Car) oder 2 (Cyc, Met) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Auch Diclofenac und Ibuprofen waren in der Lage, die Antwort der Makrophagen auf die Stimulation mit LPS zu inhibieren. Die starke Inhibierung durch die höchste Konzentration Diclofenac korrelierte jedoch mit Beeinträchtigungen der Vitalität (Tab. 3.1), da bei der höchsten Diclofenac-Konzentration von 250 µg/mL das Fluoreszenz-Signal nur bei 43,8 % im Vergleich zu unbehandelten Zellen (100 %) lag.

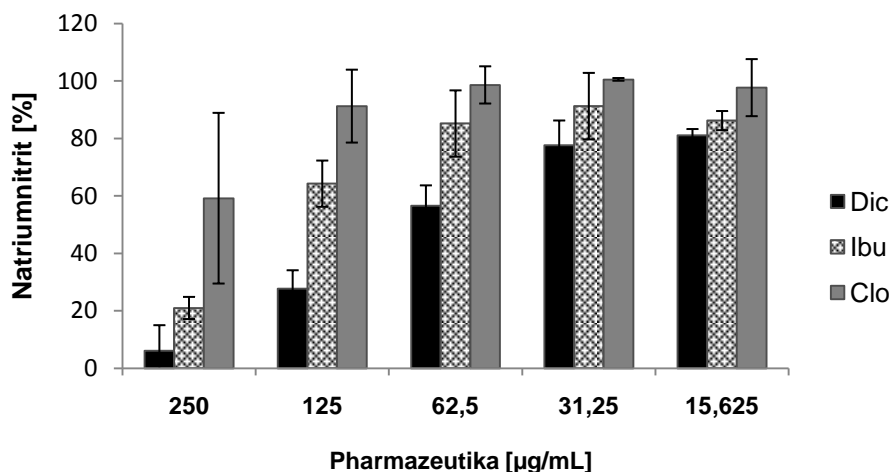


Abb. 3.11: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Diclofenac (Dic), Ibuprofen (Ibu) oder Clofibrinsäure (Clo) behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 (Dic) oder 2 (Ibu, Clo) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

In den Experimenten zur Analyse der Pharmazeutika-Wirkungen, die alle eine Inkubationsdauer von 18 h hatten, konnten auch höhere Konzentrationen eingesetzt werden als jene, die mit den 5 d Toxizitätstests ermittelt wurden. Bei Inkubationszeiten unterhalb der Generationszeit von Zellen verschiebt sich der Konzentrationsbereich toxischer Wirkungen häufig zu höheren Werten, da Sekundäreffekte, z. B. auf die Zellteilung, nicht erfasst werden. Für die RAW 264.7 Makrophagen beträgt die Generationszeit etwa 24 h [Raschke *et al.*, 1978], die Inkubation mit LPS und den Testsubstanzen jedoch nur 18 h. Das Gleiche gilt für die A-549 Zellen, die laut DSMZ eine Verdopplungszeit von ca. 40 h aufweisen. In Tabelle 3.1 sind die ermittelten CFSE-Werte zu den oben dargestellten Experimenten zusammengefasst. Die Werte wurden prozentual auf die Daten von unbehandelten Zellen des jeweiligen Experiments bezogen.

Tab. 3.1: Vitalität [%] der mit LPS und den Pharmazeutika behandelten RAW 264.7 Zellen Angegeben sind die auf unbehandelte Zellen bezogenen Mittelwerte aus dem CFSE-Test; LPS = 100 ng/mL (Standardabweichungen: vgl. Abb. 3.9 – 3.11)

| µg/mL | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | LPS |
|---------------------------|--------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-------------|
| Diclofenac | 43,8 ± 24 | 103,9 ± 27 | 98,7 ± 27 | 88,8 ± 25 | 101,2 ± 20 | 82,2 ± 9 |
| Carbamazepin | 96,4 ± 38 | 126,7 ± 40 | 108,6 ± 28 | 97,8 ± 8 | 101,0 ± 21 | |
| Clofibrinsäure | 87,3 ± 4 | 86,7 ± 24 | 83,1 ± 25 | 85,0 ± 21 | 84,8 ± 21 | |
| Cyclophosphamid | 80,9 ± 12 | 83,2 ± 15 | 84,9 ± 11 | 82,5 ± 13 | 83,9 ± 10 | |
| Ibuprofen | 88,1 ± 19 | 96,2 ± 25 | 73,1 ± 7 | 79,4 ± 18 | 83,9 ± 3 | |
| Metoprolol | 83,6 ± 1 | 84,8 ± 6 | 81,3 ± 4 | 80,9 ± 7 | 81,4 ± 7 | |
| µg/mL | 50 | 25 | 12,5 | 6,25 | 3,125 | LPS |
| Acetylsalicylsäure | 96,2 ± 13 | 99,6 ± 24 | 99,3 ± 19 | 95,9 ± 20 | 83,3 ± 13 | 81,4 ± 9 |
| Bezafibrat | 80,8 ± 6 | 94,8 ± 10 | 89,0 ± 16 | 90,5 ± 16 | 89,7 ± 17 | |
| Naproxen | 70,3 ± 2 | 75,9 ± 9 | 82,1 ± 8 | 83,5 ± 7 | 86,0 ± 9 | |

Zusätzlich sind in der Tabelle 3.1 die CFSE-Werte für die nur mit LPS behandelten Zellen aufgeführt. Diese lagen bei etwa 80 % Zellvitalität im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Da auch viele Werte der Pharmazeutika in diesem Bereich lagen, war dieser Effekt auf die Anwesenheit von LPS zurückzuführen und wurde für eine toxische Einstufung der eingesetzten Substanzen nicht berücksichtigt.

3.1.2.3 Interleukin-Produktion der A-549 Epithelzellen

Die Analyse der Effekte der verschiedenen Pharmazeutika auf die IL-Produktion der A-549 Epithelzellen erfolgte wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Die Zellen wurden mit IL-1 β als Stimulanz und den angegebenen Konzentrationen der Pharmazeutika inkubiert. Auch hier wurden zunächst die Wirkungen der Pharmazeutika allein getestet, es konnte jedoch kein Effekt festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auf die Darstellung der Ergebnisse aller neun untersuchten Pharmazeutika wird hier verzichtet, es werden lediglich die Daten gezeigt, bei denen ein Effekt detektiert werden konnte. Die Abbildungen 3.12a/b und 3.13 zeigen die Ergebnisse für IL-6 bzw. IL-8 Produktion.

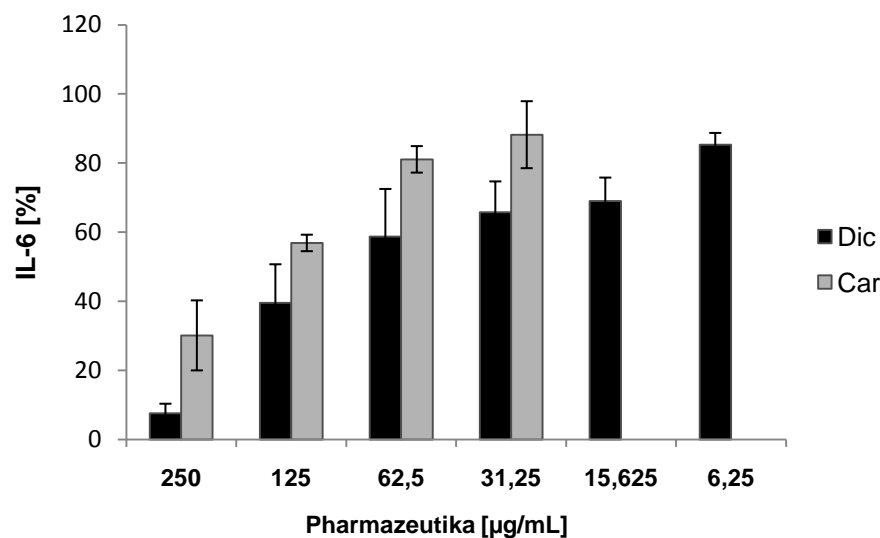


Abb. 3.12a: Interleukin-6 Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit Diclofenac (Dic) oder Carbamazepin (Car) behandelten A-549 Epithelzellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

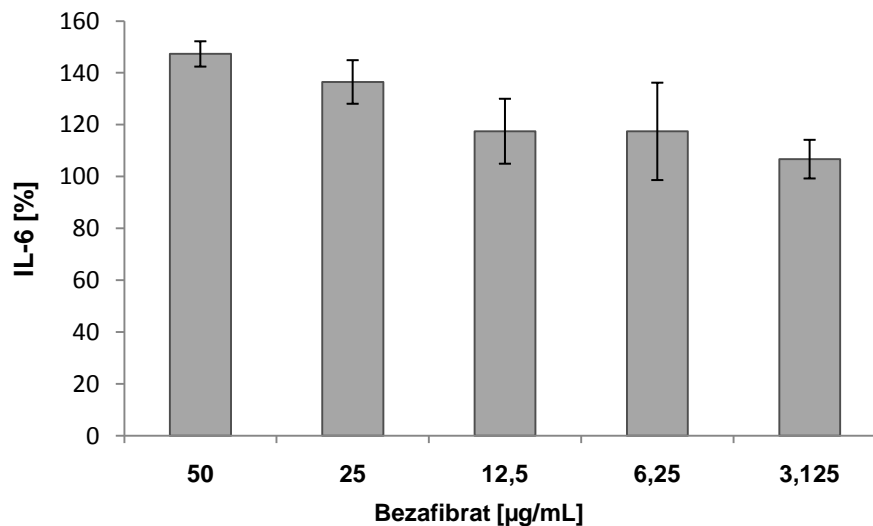


Abb. 3.12b: Interleukin-6 Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit Beza fibrat behandelten A-549 Epithelzellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

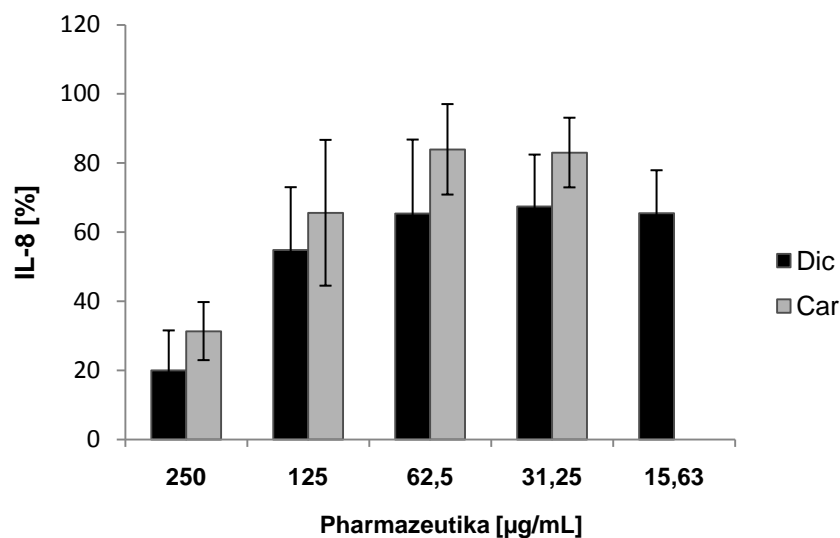


Abb. 3.13: Interleukin-8 Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit Diclofenac (Dic) oder Carbamazepin (Car) behandelten A-549 Epithelzellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

Nur Beza fibrat stimulierte die IL-6 Produktion der A-549 Zellen in Gegenwart von IL-1 β bei Konzentrationen von 50 $\mu\text{g/mL}$ bis 25 $\mu\text{g/mL}$. Ohne IL-1 β konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl bei der IL-6 als auch bei der

IL-8 Produktion zeigten Diclofenac und Carbamazepin inhibitorische Effekte. Während für Carbamazepin keine toxischen Effekte detektiert werden konnten, wurde, im Gegensatz zu den Daten für die RAW 264.7 Zellen (Tab. 3.1), für Diclofenac auch in der höchsten Konzentration kein toxischer Effekt anhand der CFSE-Werte festgestellt. Die mikroskopische Untersuchung der Zellen zeigte nach Behandlung mit Diclofenac jedoch Zellen, die hinsichtlich ihrer Morphologie verändert waren. Es konnten viele abgerundete Zellen beobachtet werden, was ein Anzeichen eines beginnenden Zellsterbens sein kann. Abbildung 3.14 zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der Zellen nach einem Experiment zur Bestimmung der IL-6 Konzentration. Gezeigt sind Zellen nach Behandlung mit den vier höchsten eingesetzten Diclofenac-Konzentrationen jeweils in Anwesenheit von IL-1 β . Als Vergleich dienen die Zellen der Positiv- (IL-1 β) und Negativkontrolle. Bei 250 μ g/mL und 125 μ g/mL Diclofenac war eine deutlich geringere Zellzahl zu verzeichnen als bei den Konzentrationen von weniger als 62,5 μ g/mL. Diese Werte korrelieren mit denen des 5 d Toxizitätstests für Diclofenac (Abb. 3.6 A).

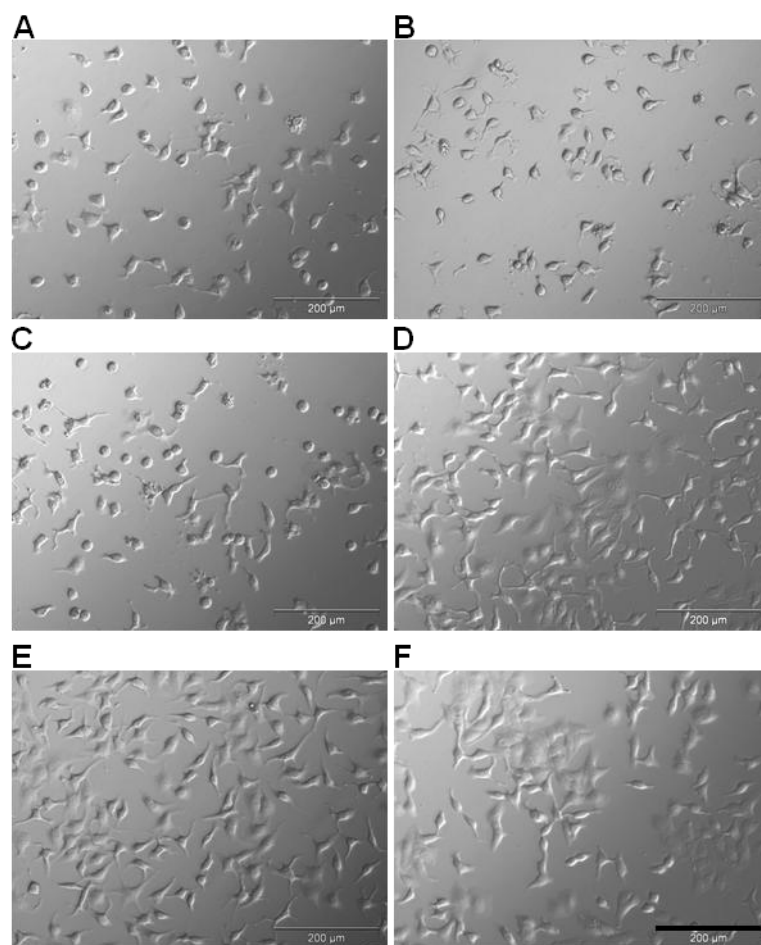


Abb. 3.14: Einfluss von Diclofenac auf die Morphologie der A-549 Zellen (A) 250 μ g/mL; (B) 125 μ g/mL; (C) 62,5 μ g/mL und (D) 31,25 μ g/mL Diclofenac; (E) 5 ng/mL IL-1 β (F) SF-DMEM; Balken = 200 μ m

Die Ursache für diesen Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es wurde daraufhin bei allen Experimenten auch immer parallel die Morphologie mikroskopisch untersucht und eventuell auftretende andere Effekte der Substanzen bei morphologisch veränderten Zellen als nicht spezifisch eingestuft.

Zu den ausgewählten Pharmazeutika (s. Tab. 2.3) gehörte zusätzlich das Antibiotikum Sulfamethoxazol. Diese Substanz zeigte jedoch keinerlei Effekt auf die physiologischen Funktionen der getesteten Zelllinien (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Analyse der Wirkung eines Pharmazeutika-Gemisches

Da die Anwendung der einzelnen Pharmazeutika nur vereinzelt und in hohen Konzentrationen zu Effekten führte, wurden zusätzlich die physiologischen Funktionen der Zellen bei Behandlung mit einem Gemisch der neun verschiedenen Substanzen analysiert. Dieser Pharma-Mix (2.3.1.1) enthielt die Stoffe jeweils in einer Konzentration von 10 µg/mL, um auftretende toxische Effekte zu minimieren. Der Pharma-Mix wurde zu den Zellen gegeben und entsprechend verdünnt. Ohne Stimulanzzugabe und bei Verwendung des unverdünnten Pharma-Mixes konnten keine Effekte festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Wurden die Zellen mit Pharma-Mix und Stimulanz inkubiert, lag die höchste Konzentration der jeweiligen Pharmazeutika bei 5 µg/mL. Die Ergebnisse der physiologischen Antworten der beiden Zelllinien zeigen die Abbildungen 3.15 bis 3.17.

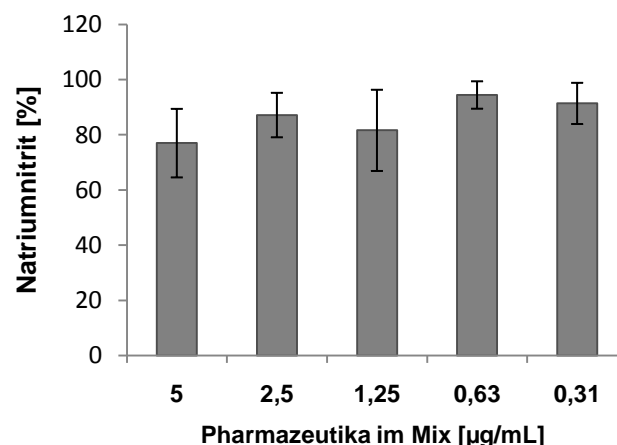


Abb. 3.15: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten RAW 264.7 Makrophagen
Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Bei den Makrophagen konnte weder ein inhibitorischer noch ein stimulierender Effekt durch den Pharmazeutika-Mix beobachtet werden (Abb. 3.15). Toxische Wirkungen zeigten sich ebenfalls nicht. Die IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen war ebenfalls nicht beeinträchtigt (Abb. 3.16). Für IL-8 konnte eine Inhibierung der Produktion um 20 % bei 5 µg/mL und 2,5 µg/mL verzeichnet werden (Abb. 3.17).

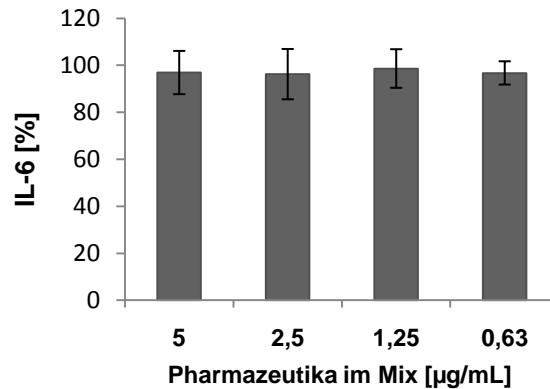


Abb. 3.16: IL-6 Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten A-549 Epithelzellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

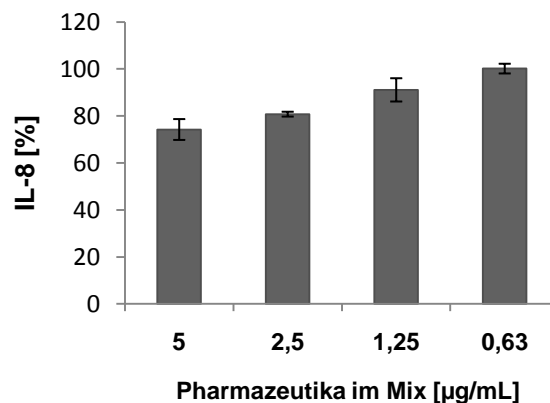


Abb. 3.17: IL-8 Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten A-549 Epithelzellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

Alle Ergebnisse mit den Lösungen der Pharmazeutika zeigten nur in den höchsten angewandten Konzentrationen bei einzelnen Substanzen Effekte auf die untersuchten Parameter. Die in der Umwelt vorgefundenen Konzentrationen der Pharmazeutika liegen weit unterhalb von denen (ng/L versus mg/L), für die Effekte detektiert werden konnten. Es konnte

jedoch gezeigt werden, dass die ausgewählten Zelllinien und Parameter in der Lage sind, Störungen der physiologischen Funktion der Zellen anzuzeigen.

3.1.4 Analyse der Wirkung nativer Wasserproben

Um auch umweltrelevante Aspekte zu erfassen, wurden in den Testsystemen der beiden Zelllinien zusätzlich native Wasserproben auf ihre Wirkungen hin untersucht. Dazu wurden im Klärwerk Steinhof der Stadt Braunschweig Proben des Kläranlagenzulaufs sowie des Kläranlagenablaufs genommen. Der Ablauf gelangt durch einen Seitenarm direkt in den Fluss Oker und ist somit Teil des aquatischen Ökosystems. Eine weitere Probe stammte aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Radke, Lehrstuhl für Hydrologie der Universität Bayreuth. Es handelte sich dabei um Wasser aus dem Roten Main bei Bayreuth. Die Wasserproben wurden entsprechend Kapitel 2.3.2 aufbereitet und analysiert und für die Experimente in der Zellkultur eingesetzt. Die Konzentrationen der in den Proben vorhandenen Pharmazeutika sind den Tabellen 2.5 und 2.6 zu entnehmen.

3.1.4.1 Beeinträchtigung der physiologischen Zellfunktion durch native Wasserproben

Die Wasserproben wurden zunächst verdünnt zu den Zellen gegeben, wobei auch hier die physiologischen Antworten der Makrophagen und Epithelzellen jeweils ohne und mit Stimulanz getestet wurden. Abbildung 3.18 zeigt den Effekt des Wassers in Anwesenheit von LPS.

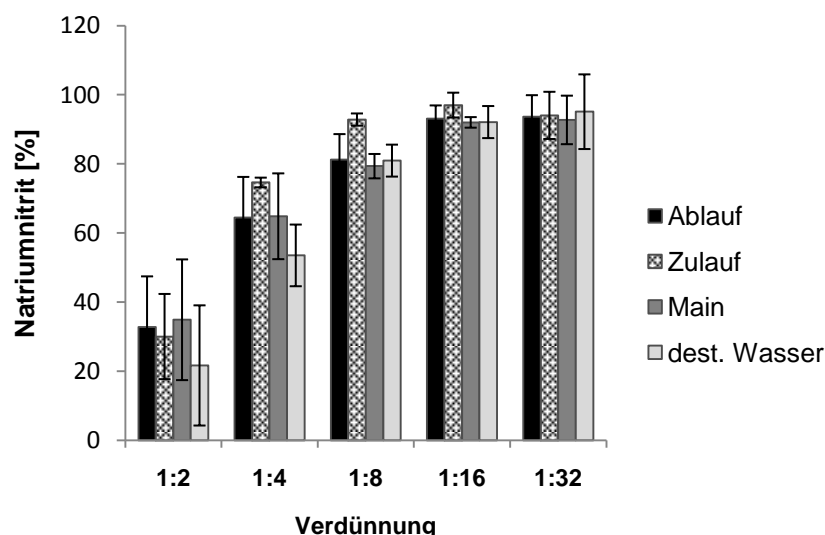


Abb. 3.18: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit nativen Wasserproben behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Die Makrophagen zeigten bei der Behandlung mit den Wasserproben eine Inhibition der durch LPS aktivierten NO-Produktion in den Verdünnungen 1:2 und 1:4. Das als Kontrolle eingesetzte destillierte Wasser, welches zuvor analog zu den nativen Wasserproben aufbereitet wurde, wies jedoch den gleichen Effekt auf. Daher handelte es sich offensichtlich um Effekte, die durch die starke Verdünnung des Kulturmediums hervorgerufen wurden und nicht auf Wasserinhaltsstoffe zurückgeführt werden konnten. Es wurden zudem weder eine morphologische Veränderung der Zellen noch toxische Effekte festgestellt. Allerdings zeigte sich, dass auch ohne LPS eine Stimulation der NO-Produktion durch die Wasserproben beobachtet werden konnte (Abb. 3.19).

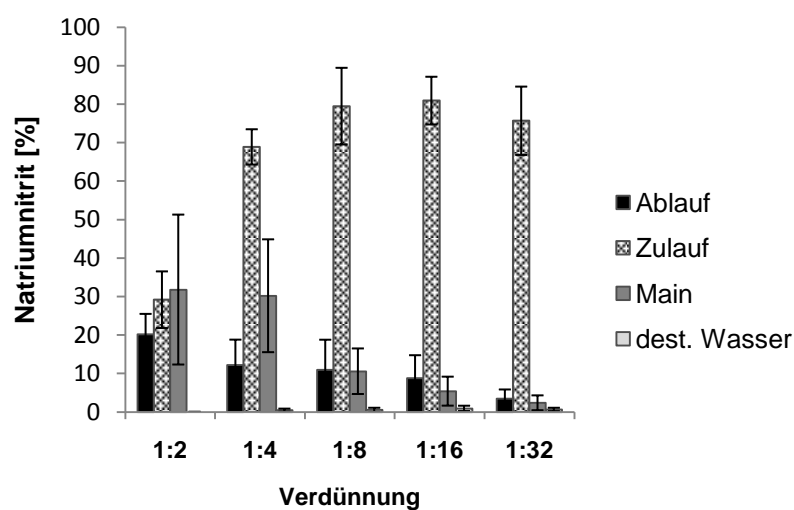


Abb. 3.19: NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit nativen Wasserproben Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Während das Main- und das Ablauf-Wasser nur bei Verdünnungsfaktoren von 2 und 4 die NO-Produktion aktivierten, konnte beim Zulauf-Wasser ein Anstieg nahezu bis auf das Niveau der Positivkontrolle verzeichnet werden. Auch in der höchsten Verdünnung von 1:32 lag der gemessene Natriumnitrit-Gehalt der Proben bei 80 %. Das als Kontrolle eingesetzte destillierte Wasser zeigte keinen aktivierenden Effekt. Auch die A-549 Zellen wurden mit und ohne Zugabe von IL-1 β einer Behandlung mit den verschiedenen Wasserproben unterzogen. Die IL-Produktion wurde bei Stimulanzanwesenheit ebenfalls durch die starke Verdünnung des Kulturmediums inhibiert (Daten nicht gezeigt). Für die Analyse des Wassers ohne Zugabe von IL-1 β zeigten sich im Vergleich zu den Makrophagen keine deutlich aktivierenden Effekte (Abb. 3.20). Nur der Kläranlagen-Zulauf zeigte eine minimale Induktion der IL-6 Produktion.

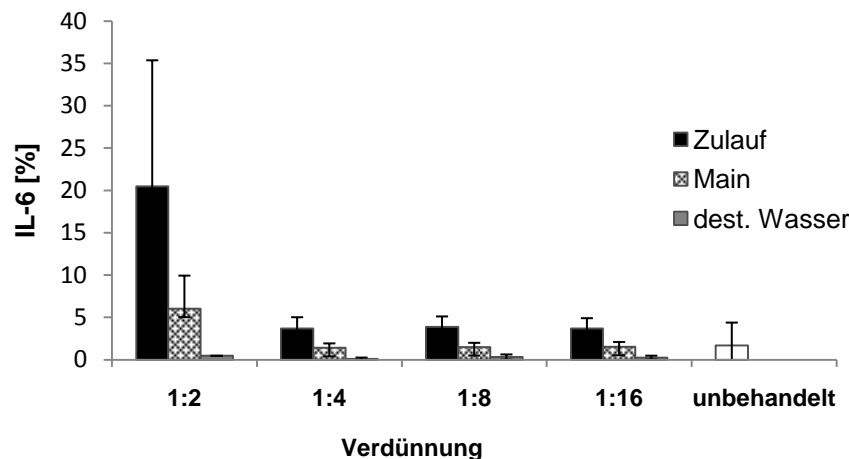


Abb. 3.20: IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen nach Behandlung mit nativen Wasserproben Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

Die Produktion von IL-8 war nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt). Um den stimulierenden Effekt auf die Makrophagen noch weiter zu untersuchen und die Verdünnungseffekte auszuschließen, wurde aus dem Kläranlagen-Ablauf- und Zulauf-Wasser Kulturmedium (DMEM) hergestellt (2.3.2.1).

3.1.4.2 Effekt des Kläranlagen-Kulturmediums auf die NO-Produktion der RAW 264.7 Zellen

Um die mit den Wasserproben durch Verdünnung des Kulturmediums aufgetretenen inhibierenden Effekte auszuschließen, wurde zunächst das aus Zulauf- und Ablauf-Wasser hergestellte Medium (Zulauf-DMEM und Ablauf-DMEM, 2.3.2.1) zusammen mit LPS als Stimulanz getestet. Als Kontrolle diente DMEM, welches mit destilliertem Wasser angesetzt wurde. Alle angesetzten Medien zeigten keinen Effekt auf die NO-Produktion der stimulierten Makrophagen (Abb. 3.21). Daraufhin wurden die Zellen in den Medien ohne LPS-Zugabe inkubiert. Während das Ablauf-DMEM zu einer Induktion der NO-Produktion von 50 % führte, wurden für das Zulauf-Medium Werte ermittelt, die denen der Positivkontrolle (100 ng/mL LPS) entsprachen (Abb. 3.22).

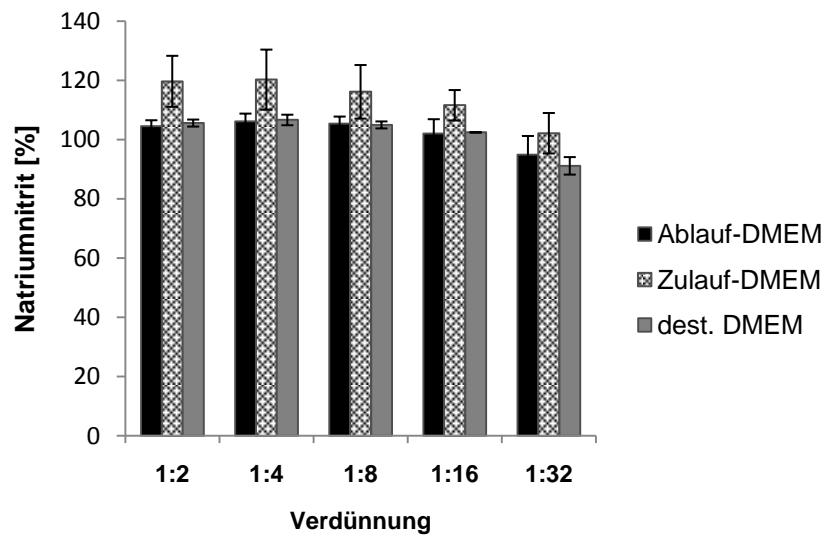


Abb. 3.21: NO-Produktion der mit LPS stimulierten und mit Zulauf- und Ablauf-DMEM behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; Verdünnung in DMEM + 10% FBS; LPS = 100%.

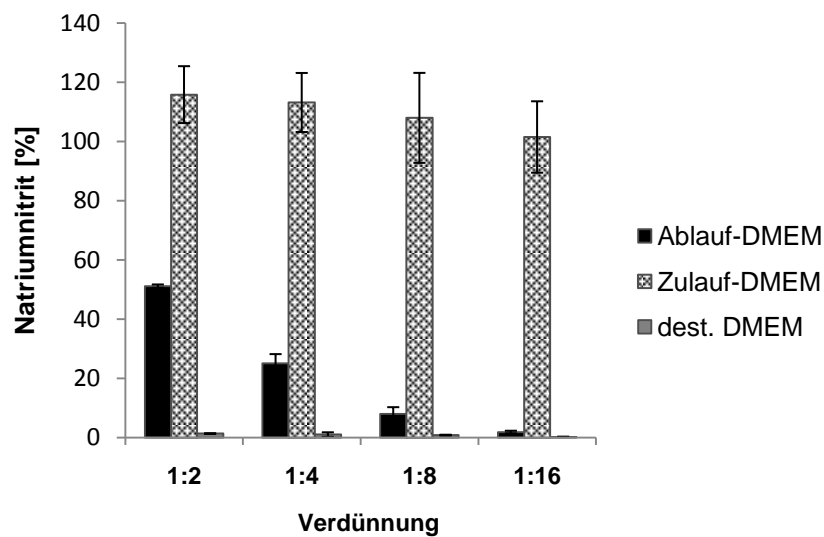


Abb. 3.22: NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit Zulauf- und Ablauf-DMEM Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 (Ablauf-DMEM, dest. DMEM) oder 3 (Zulauf-DMEM) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; Verdünnung in DMEM + 10% FBS; LPS = 100%.

In den A-549 Epithelzellen wurden die Effekte nicht beobachtet. Da durch die vorangegangenen Versuche eine Beteiligung der Pharmazeutika an den aktivierenden Effekten ausgeschlossen werden konnte, waren weitere Analysen zur Aufklärung des stimulierenden Effekts in den Makrophagen notwendig.

3.1.4.3 Untersuchungen zum aktivierenden Effekt der Wasserproben

Durch den Ausschluss der Pharmazeutika als aktivierende Faktoren wurde eine weitere Substanzklasse mit in die Analysen einbezogen. In der Literatur war beschrieben worden, dass Methoxychlor (Mxc), ein als Umweltkontaminante bekanntes Pestizid, die NO-Produktion von Makrophagen durch die Aktivierung des NF- κ B Signalweges stimulieren kann [Kim *et al.*, 2005]. Die Substanz wurde hinsichtlich ihrer Wirkung auf die NO-Produktion der RAW 264.7 Zellen untersucht. Die Zellen wurden jeweils mit Methoxychlor allein und in Kombination mit LPS inkubiert (Abb. 3.23).

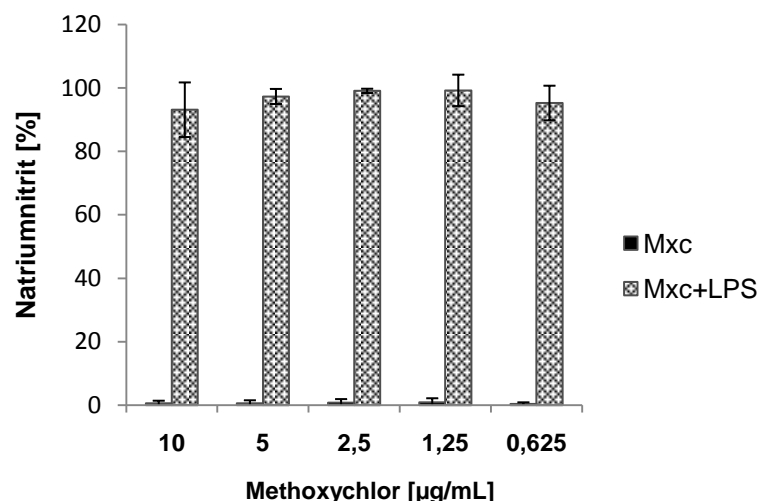


Abb. 3.23: NO-Produktion der mit LPS stimulierten/unstimulierten und mit Methoxychlor behandelten RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Die in der Literatur beschriebenen Effekte konnten nicht bestätigt werden, da Methoxychlor allein die NO-Bildung nicht anregte und auch keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Produktion von NO hatte. Daraufhin wurde auch ein Extrakt der gelösten organischen Feststoffe (2.3.2.1), die im Zulauf-Wasser enthalten waren, untersucht. Das Verhalten des Extrakts im Test auf die NO-Produktion entsprach jedoch dem der Methanol-Lösungsmittelkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Durch die starke Ausprägung des Effekts in den Makrophagen, wurde vermutet, dass in den Wasserproben Endotoxine, zu denen u. a. LPS gehört, vorkommen, welche für die Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade und die daraus resultierende NO-Produktion verantwortlich sind. Das Zulauf-Wasser wurde daher einer Behandlung unterzogen, bei der mit Hilfe einer PolymyxinB-Säule Endotoxine aus wässrigen Proben entfernt werden (2.3.2.1). Abbildung 3.24 zeigt, dass die aktivierenden Effekte des Wassers komplett auf die enthaltenen Endotoxine und/oder deren Bestandteile zurückzuführen waren (vgl. Abb. 3.19).

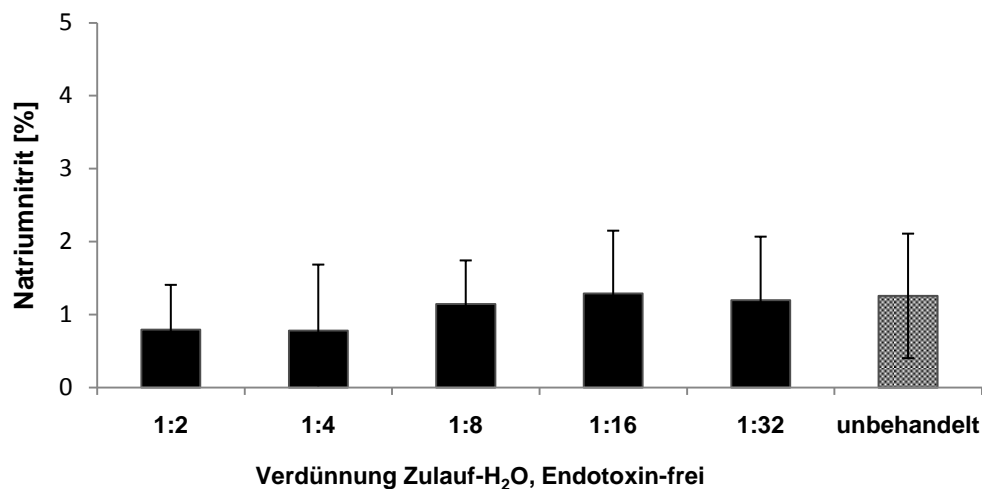


Abb. 3.24: NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen nach Behandlung mit Endotoxin-freiem Zulauf-Wasser Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; LPS = 100%.

Auch das Zulauf-DMEM wurde einer Behandlung zur Entfernung der Endotoxine unterzogen. Dies war jedoch nicht erfolgreich. Nach Rücksprache mit dem Anbieter des Kits wurde dies darauf zurückgeführt, dass Medienbestandteile die Entfernung verhindern können.

Die nur schwach ausgeprägte aktivierende Wirkung des Wassers auf die IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen, wurde dadurch erklärt, dass die Zellen nicht auf die Stimulation mit Endotoxinen wie LPS reagierten. Zudem bestätigten FACS-Analysen, dass der für die Erkennung von LPS benötigte TLR4-Rezeptor [Medzhitov, 2001] auf der Zelloberfläche der A-549 Zellen nicht nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Kokultivierung von RAW 264.7 und A-549 Zellen

An der Antwort eines Organismus auf eine Stimulation sind nicht nur einzelne Zelltypen beteiligt, sondern es findet eine Kommunikation zwischen verschiedenen Zelltypen durch die Sekretion von Signalstoffen. Daher wurden die RAW 264.7 Makrophagen zusammen mit den A-549 Epithelzellen kultiviert. Die unterschiedliche Herkunft der Zelllinien aus Maus und Mensch wurde hier nicht berücksichtigt, da aus vorangegangenen Versuchen bekannt war, dass die humanen A-549 Zellen mit dem Botenstoff TNF- α aus der Maus stimuliert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Als Stimulanz für die Zellen in Kokultur wurde LPS (100 ng/mL) verwendet und als Parameter wurde die IL-6 Produktion der A-549 Zellen bestimmt. Zusätzlich wurden das Zulauf-Wasser sowie das Zulauf-DMEM ohne LPS-Zusatz und der Pharmazeutika-Mix zusammen mit LPS eingesetzt. In den A-549 Zellen konnte als Folge der Stimulation der RAW 264.7 Makrophagen die Produktion von IL-6 induziert werden (Abb. 3.25). Die Kontrolle, in der nur die A-549 Zellen mit LPS stimuliert wurden, zeigte keine IL-6 Produktion. Da eine Kommunikation der Zellen über das murine TNF- α , welches die RAW 264.7 Zellen nach LPS-Stimulation u. a. produzieren [Park *et al.*, 2002], möglich erschien, wurde ein Antikörper eingesetzt, der TNF- α komplexiert und so neutralisiert.

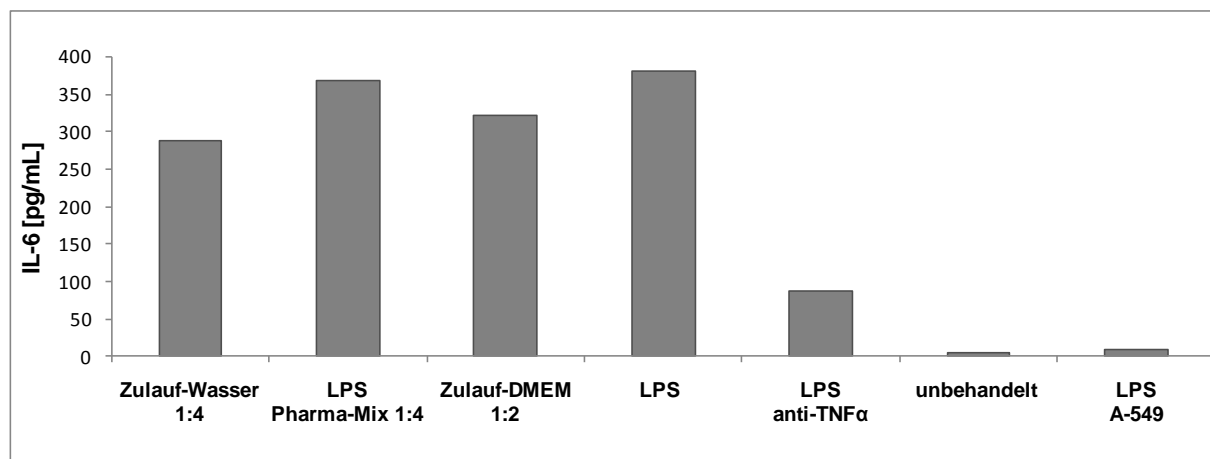


Abb. 3.25: IL-6 Produktion der A-549 Epithelzellen in Kokultur mit RAW 264.7 Makrophagen Dargestellt sind exemplarisch die Mittelwerte eines Experiments mit 2 Replikaten.

Die mit LPS und dem Antikörper behandelte Kokultur wies nur noch eine geringe IL-6 Produktion auf, womit die Kommunikation der beiden Zelltypen über diesen Botenstoff bestätigt werden konnte. Die Behandlungen mit den Wasserproben und dem Pharmazeutika-Gemisch zeigten in der Tendenz keine unterschiedlichen Ergebnisse zu den Tests mit den

Zellen in Einzelkultur. Die im Wasser enthaltenen Endotoxine führten hier ebenfalls zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalwegs und der damit verbundenen Produktion von TNF- α , die in den A-549 Zellen zu einem Anstieg der IL-6 Konzentration führte. Der Pharmazeutika-Mix hatte auch hier keinen Einfluss. Daher wurden die Analysen der Wirkungen von Pharmazeutika über Kokultivierung von Zellen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die physiologischen Funktionen im Hinblick auf eine Aktivierung des NF- κ B Signalwegs von Makrophagen und Epithelzellen durch die Zugabe von Bezafibrat, Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen beeinträchtigt werden konnten. Die dafür notwendigen Konzentrationen lagen aber deutlich über dem umweltrelevanten Bereich. Die nativen Wasserproben zeigten vor allem für die Makrophagen stimulierende, den NF- κ B Signalweg aktivierende Effekte, die jedoch auf die im Wasser befindlichen Endotoxine und/oder deren Bestandteile zurückgeführt werden konnten.

Die Bestimmung der Proteine, die als physiologische Antwort auf eine Aktivierung der NF- κ B Signalkaskade in den untersuchten Zellen gebildet werden, lassen nur indirekte Aussagen über die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors zu, da auch andere Mechanismen die Sekretion beeinflussen können (s. z. B. IL-8). Daher wurde im Folgenden die NF- κ B Aktivierung mit Hilfe eines Reporterzellsystems betrachtet.

3.2 Beeinträchtigung der NF- κ B-Aktivierung in einem Reporterzellsystem

Für die Reporterzell-Analysen wurden die A-549 Epithelzellen stabil transfiziert (2.2.5). Das verwendete Plasmid pNiFty2-SEAP (Abb. 2.1) codiert für die sekretorische embryonische alkalische Phosphatase (SEAP) als Reporterprotein. Die NF- κ B Abhängigkeit der SEAP-Produktion wird durch eine artifizielle ELAM-Promotorregion mit fünf NF- κ B Erkennungssequenzen [Schindler & Baichwal, 1994] gewährleistet. Das Reporterprotein wurde nach Aktivierung von NF- κ B gebildet und konnte im Medienüberstand nach Substratzugabe nachgewiesen werden (2.2.9).

3.2.1 Funktionsanalyse der Reporterzellen

Die *Limited Dilution* Methode (2.2.5.5) wurde angewandt, um Einzelzellklone zu gewinnen, die eine stabile und homogene Aktivierung des Reporterproteins erlauben. Durch erste Funktionstests stellte sich der Klon 1A11 als geeignet heraus und wurde für alle Untersuchungen in dieser Arbeit verwendet. Dazu trug u. a. die stabile Expression des Reportergens auch über bis zu 35 Zellpassagen bei. Die Funktionalität der 1A11 Zellen wurde mit den beiden Stimulanzen IL-1 β und TNF- α getestet (Abb. 3.26). Der Nachweis der gebildeten SEAP erfolgte wie in Kapitel 2.2.9.2 beschrieben. Die gemessene Fluoreszenz diente als Maß für den Grad der NF- κ B Aktivierung. Die Ergebnisse zeigen, dass die Reporterzellen deutlich sensibler auf die Stimulation mit IL-1 β reagierten als mit TNF- α . Da auch in allen vorangegangenen Experimenten mit den A-549 Wildtyp-Zellen mit 5 ng/mL IL-1 β gearbeitet wurde und diese Konzentration sehr robuste Signale lieferte, wurde diese auch in den Stimulationsexperimenten mit den 1A11 Zellen angewandt. Analog zu den Ergebnissen der physiologischen Parameter wurden die ermittelten Daten prozentual auf die Positivkontrolle (5 ng/mL IL-1 β) bezogen. Um den Unterschied zum Hintergrundsignal deutlich zu machen, wurden die Werte der unbehandelten Zellen z. T. mit dargestellt.

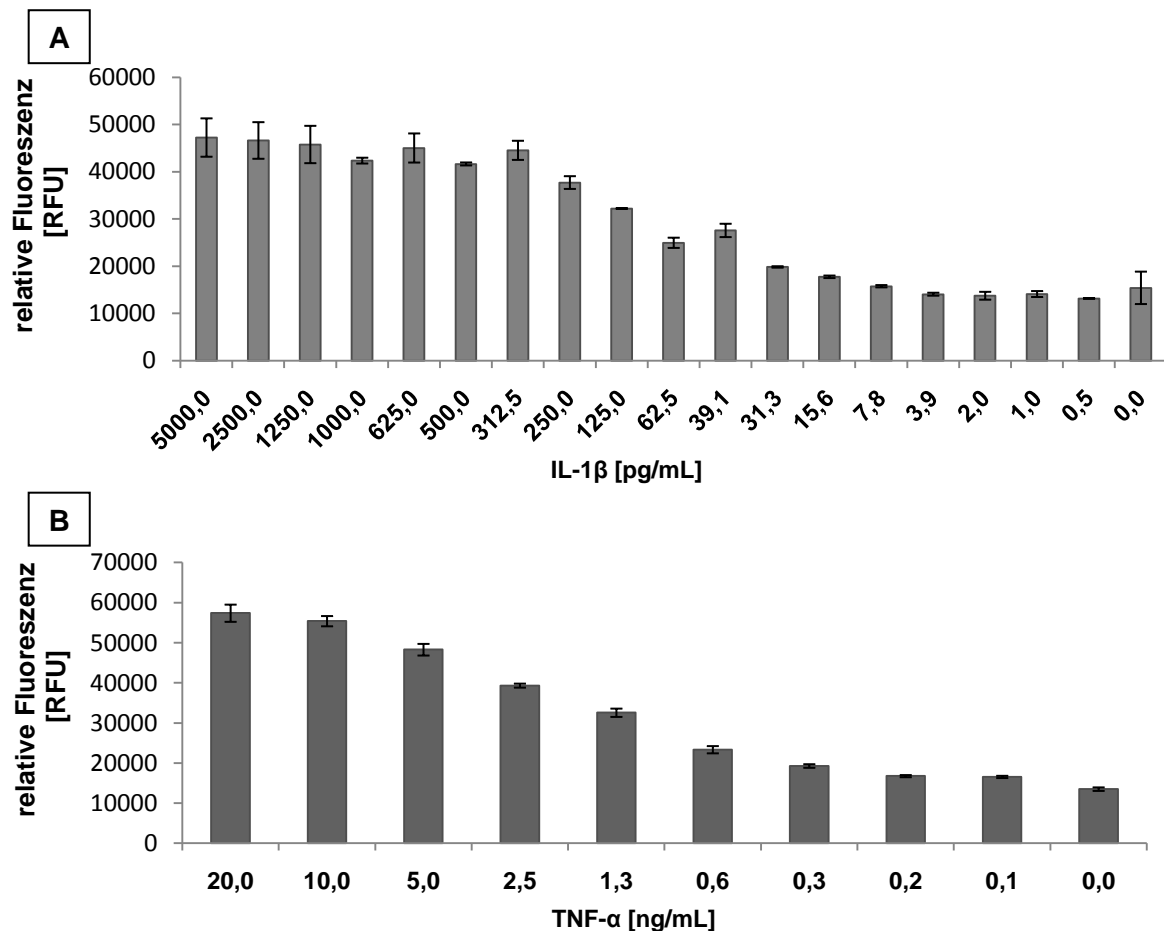


Abb. 3.26: SEAP-Produktion der 1A11 Zellen

Stimulation mit (A) IL-1 β oder (B) TNF- α ; Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 2 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten (A) bzw. exemplarisch die Mittelwerte eines Experiments mit 2 Replikaten (B).

Die Validierung des Testsystems erfolgte auch hier durch den Einsatz eines spezifischen NF- κ B Inhibitors. Wie für die RAW 264.7 und die A-549 Zellen wurde zunächst BAY 11-7082 verwendet. Es konnte hier jedoch keine Inhibierung des IL-1 β abhängigen Reportersignals detektiert werden (Abb. 3.27). Auch bei Verwendung von TNF- α als Stimulanz oder von niedrigeren IL-1 β Konzentrationen als 5 ng/mL konnte keine Inhibition durch BAY 11-7082 erreicht werden (Daten nicht gezeigt). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Ursache nicht geklärt werden. Daher wurde anhand von Literaturangaben Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) als ein weiterer NF- κ B Inhibitor ausgewählt [Liu *et al.*, 1999]. Der Wirkmechanismus dieses Antioxidants ist noch nicht komplett geklärt [Bubici *et al.*, 2006]. PDTC bewirkte eine vollständige Inhibierung des durch IL-1 β stimulierten Reportersignals (Abb. 3.28).

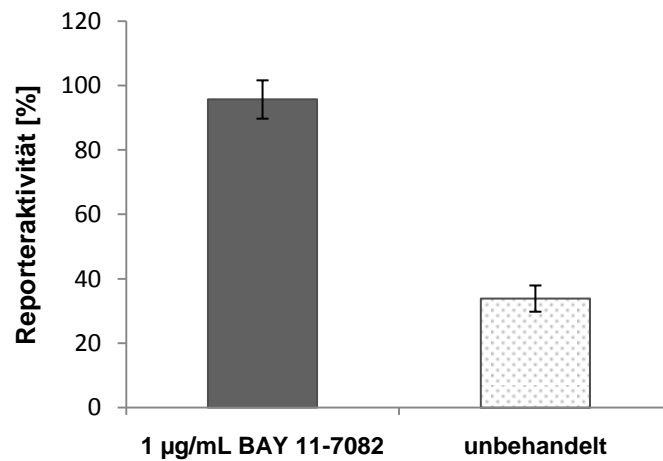


Abb. 3.27: SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit BAY 11-7082 behandelten 1A11 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

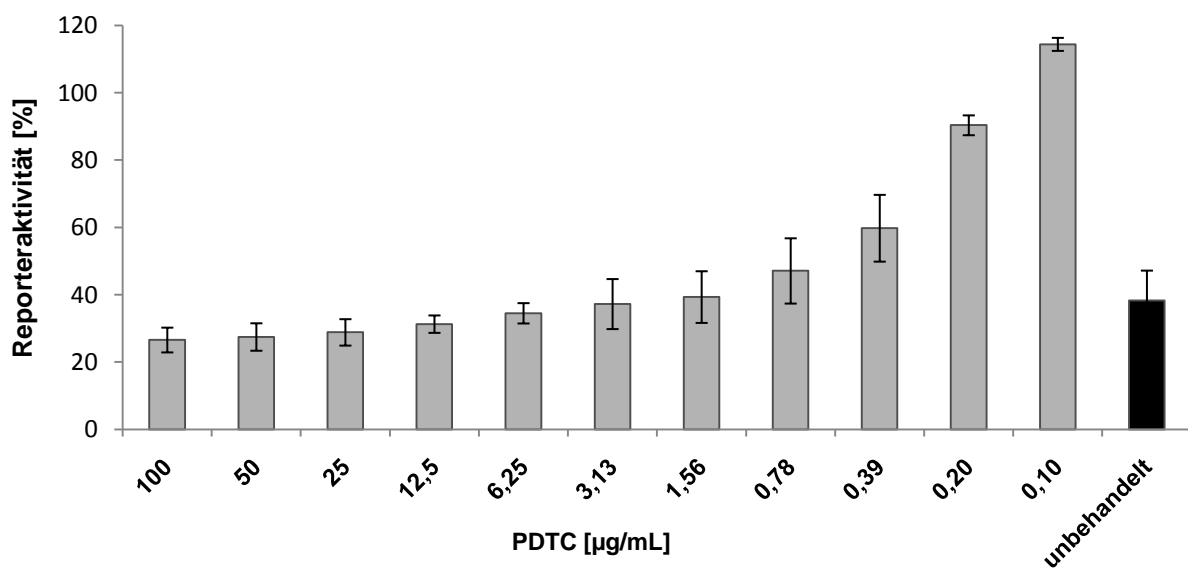


Abb. 3.28: SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit den angegebenen PDTC-Konzentrationen behandelten 1A11 Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

3.2.2 Analyse der Wirkung ausgewählter Pharmazeutika auf die NF- κ B Aktivierung

Die Untersuchungen erfolgten analog zu den Analysen der physiologischen Proteine (2.2.9). Die Reporterzellen wurden zunächst mit den einzelnen pharmazeutischen Substanzen inkubiert. Auf die Darstellung der Ergebnisse aller neun untersuchten Pharmazeutika wird hier verzichtet, es werden lediglich die Daten gezeigt, bei denen ein Effekt detektiert werden konnte. In Abbildung 3.29 sind die Ergebnisse für Diclofenac, Carbamazepin und Ibuprofen dargestellt.

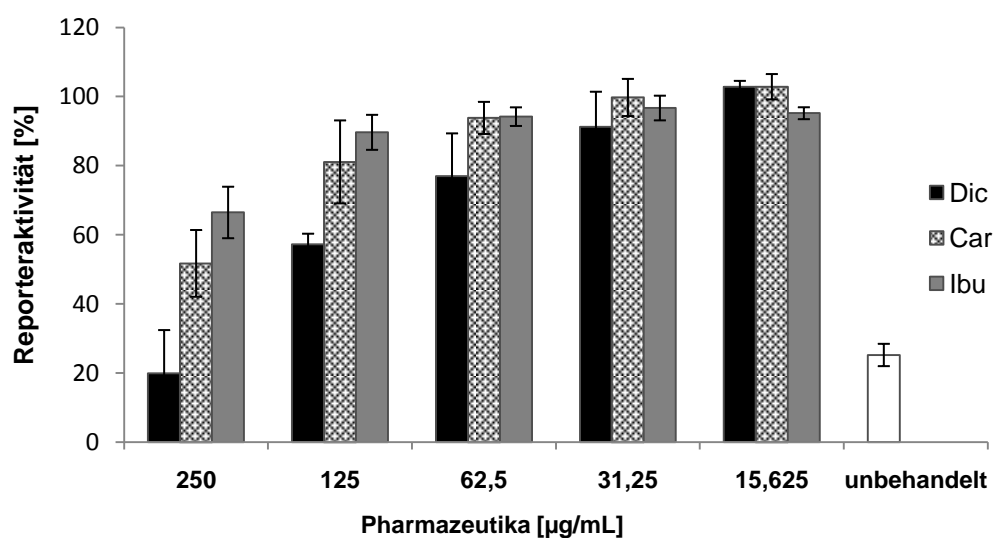


Abb. 3.29: SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit Diclofenac (Dic), Carbamazepin (Car) oder Ibuprofen (Ibu) behandelten 1A11 Zellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

Die Reporterzellen zeigten für Carbamazepin und Ibuprofen eine Inhibition der NF- κ B Aktivierung bei einer eingesetzten Konzentration von 250 µg/mL. Eine Korrelation mit den über CFSE ermittelten Toxizitätswerten konnte nicht beobachtet werden. Diclofenac zeigte bis zu einer Konzentration von 62,5 µg/mL eine Inhibition des Reportersignals. Die starke Reduzierung bei 250 µg/mL war vermutlich auch hier durch toxische Effekte bedingt (CFSE-Test). Insgesamt zeigten die Untersuchungen der einzelnen Pharmazeutika analoge Ergebnisse zur IL-6 Produktion der A-549 Zellen. Folglich wurde auch das Pharmazeutika-Gemisch (3.1.3) im Reporterzellensystem getestet (Abb. 3.30). Wie auch für die RAW 264.7 und die A-549 Zellen konnten keine Effekte auf die NF- κ B Aktivierung bei der Anwendung des Pharmazeutika-Gemisches detektiert werden.

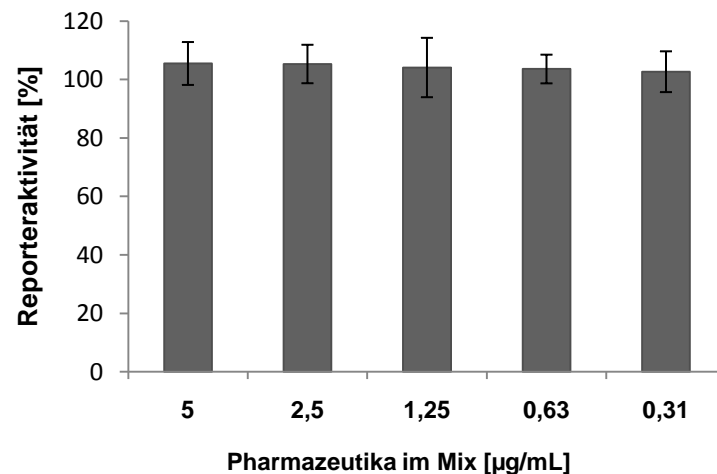


Abb. 3.30: SEAP-Produktion der mit IL-1 β stimulierten und mit einem Pharmazeutika-Gemisch behandelten 1A11 Zellen Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

3.2.3 Analyse der Wirkung nativer Wasserproben auf die NF- κ B

Aktivierung

Die Effekte der nativen Wasserproben auf die 1A11 Reporterzellen entsprachen der physiologischen Antwort der A-549 Zellen. Nur beim Kläranlagenzulauf-Wasser und beim Zulauf-DMEM konnte ein minimal aktivierender Effekt ohne Stimulanzzugabe verzeichnet werden (Abb. 3.31). Die Zellen zeigten bei Behandlung mit dem Endotoxin-freien Wasser diesen Effekt nicht mehr.

Die Ergebnisse der Analysen im Reporterzellsystem bestätigten die anhand der physiologischen Proteinantwort gewonnenen Erkenntnisse. Es konnten auch hier keine umweltrelevanten Effekte detektiert werden. Die bisherigen Untersuchungen konzentrierten sich auf die NF- κ B abhängige Synthese von einzelnen Proteinen. Die durch die NF- κ B Signalkaskade ausgelöste Zellantwort ist jedoch komplexer und vielfältiger. Einen Überblick über einen Großteil der nach einer Stimulation ablaufenden Reaktionen innerhalb der Zellen können dabei Genexpressionsanalysen liefern.

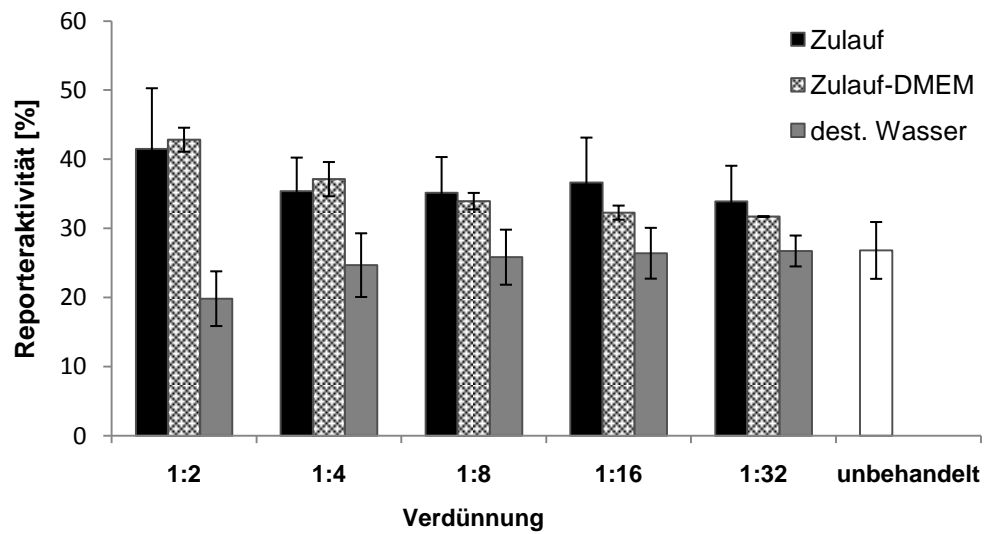


Abb. 3.31: SEAP-Produktion der 1A11 Zellen nach Behandlung mit nativen Wasserproben Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 4 (Zulauf), 3 (Zulauf-DMEM) oder 2 (dest. Wasser) unabhängigen Experimenten mit jeweils 2 Replikaten; IL-1 β = 100%.

3.3 Genexpressionsanalysen

Die Analyse der in den A-549 Zellen vorliegenden mRNA Transkripte erfolgte mittels einer quantitativen Echtzeit-PCR. Dafür wurde ein spezielles Kit-System der Firma SABiosciencesTM verwendet, das eine Analyse der Expression von 84 Genen erlaubt, die in Zusammenhang mit dem NF- κ B Signalweg stehen (2.2.11). Eine Liste aller Gene und die Rohdaten aller Experimente (CP-Werte) befinden sich im Anhang dieser Arbeit (6.1 und 6.2). Die CP- (*crossing point*) Werte dienten bei allen Berechnungen als Grundlage. Je höher der CP-Wert desto weniger mRNA bzw. cDNA lag in dieser Probe zu Beginn der RT-PCR vor. Ein niedriger CP-Wert zeigte also eine erhöhte Expression des jeweiligen Gens an. Die Berechnung des in der Ergebnisdarstellung verwendeten Wertes für den *Fold Change* findet sich in Kapitel 2.2.11.2.

3.3.1 RT² ProfilerTM PCR Array: *Human NF- κ B Signaling Pathway*

Die Untersuchungen mit Hilfe dieses Kits folgten strikt den Herstellerangaben und die Auswertung wurde wie im Kapitel 2.2.11.2 durchgeführt. Das Kit enthielt sechs sogenannte Haushaltsgene (*Housekeeping genes*, HKG), deren Expression bei den verschiedenen Behandlungen unverändert bleiben sollte. Da dies nicht der Fall war, wurden nur zwei Gene zur Normalisierung herangezogen, deren Expression in allen Behandlungen gleich war. Dabei handelte es sich zum einen um *HPRT1* (Hypoxanthin-phosphoribosyltransferase 1), zum anderen um *RPL13A* (Ribosomales Protein L13a). Die Behandlungen, nach denen Genexpressionsanalysen durchgeführt wurden, sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Die Ergebnisse des PCR-Arrays werden mit Hilfe der *Fold Change*-Werte angegeben. Der *Fold Change* gibt dabei an, inwiefern sich die Expression eines Gens von Interesse (GOI) im Vergleich zu demselben Gen in der Kontrollbehandlung verändert. Der Wert für das Gen in der Kontrolle hat dabei einen Wert von eins. Das bedeutet, dass alle Werte größer als eins eine Hochregulation oder Induktion der Genexpression, Werte zwischen null und eins hingegen eine Herunterregulierung des GOI anzeigen.

Tab. 3.2: Zusammenfassung der im RT² PCR Array untersuchten Behandlungen der A-549 Epithelzellen

| Behandlung | Abkürzung |
|---|--------------|
| Kontrolle (SF-DMEM) | SF |
| IL-1 β 5 ng/mL | IL |
| TNF- α 10 ng/mL | TNF |
| IL-1 β 5 ng/mL und BAY 11-7082 1 μ g/mL | IL + BAY |
| IL-1 β 5 ng/mL und Diclofenac 50 μ g/ml | IL + Dic 50 |
| Diclofenac 50 μ g/mL | Dic 50 |
| IL-1 β 5 ng/mL und Ibuprofen 50 μ g/ml | IL + Ibu 50 |
| IL-1 β 5 ng/mL und Diclofenac 1 μ g/ml | IL + Dic 1 |
| Zulauf-Wasser 1:2 | Zu-H2O |
| Zulauf-Wasser, Endotoxin-frei 1:2 | Zu-H2O, frei |

Zunächst wurden die Gene betrachtet, von denen bekannt ist, dass ihre Expression durch eine IL-1 β Behandlung induziert wird (Abb. 3.32). Neben *IL-6* und *IL-8* wurde dabei auch das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*ICAM1*) ausgewählt, da die Expression dieses Gens speziell in den A-549 Zellen von einer NF- κ B Aktivierung abhängig ist [Holden *et al.*, 2004].

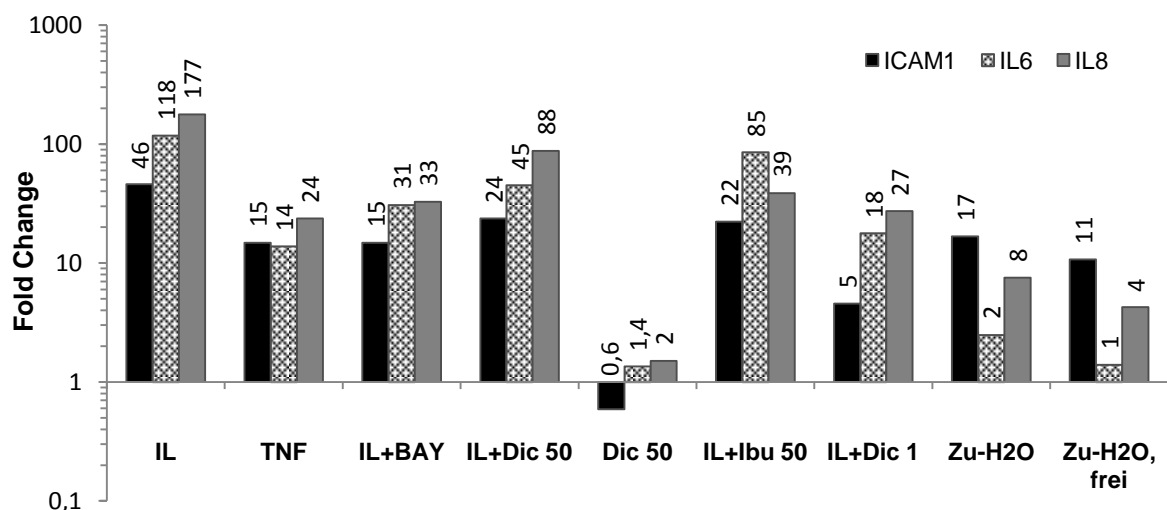


Abb. 3.32: Expression der Gene *ICAM1*, *IL-6* und *IL-8* nach verschiedenen Behandlungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung
Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; (SF-DMEM = 1).

Nach einer Stimulation mit IL-1 β wurden alle drei Gene deutlich höher exprimiert als in den Kontrollzellen. *ICAM1* zeigte eine etwa 45-fache, *IL-6* und *IL-8* jeweils eine etwa 100- bis 150-fache Hochregulation, welche durch die gleichzeitige Inkubation mit BAY 11-7082 auf etwa 25 % inhibiert werden konnte. Auf Ebene der Transkription konnte hier auch eine deutliche Reduktion der *IL-8* Genexpression gezeigt werden, die bei der Analyse des IL-8 Proteins nicht detektiert wurde. Die nur mit Diclofenac behandelte Probe wies keine Veränderung in der Expression der IL-Gene auf, es konnte jedoch eine Herunterregulierung von *ICAM1* beobachtet werden. Dies korreliert mit den morphologischen Veränderungen der Zellen bei einer Diclofenac-Konzentration von 62,5 $\mu\text{g/mL}$ (Abb. 3.14). Die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls, welches als Glykoprotein auf der Zelloberfläche u. a. die Bindung an weitere Zelltypen vermittelt [Tosi *et al.*, 1992], könnte somit eine Erklärung für die beobachtete Abrundung und die verminderte Anheftung der Zellen an den Untergrund geben.

Die Ergebnisse der mit Zulauf-Wasser behandelten Zellen zeigten wiederum eine Erhöhung der *ICAM1*-Expression um das 16-fache (Zulauf-Wasser) und das 10-fache (Zulauf-Wasser, endotoxin-frei) an. Die im Wasser enthaltenen Endotoxine schienen einen Effekt auf die Genexpression auszuüben. Die Expression von *IL-6* wurde nicht beeinflusst, bei *IL-8* konnte ein Anstieg um das 7-fache (Zulauf-Wasser) und das 4-fache (Zulauf-Wasser, Endotoxin-frei) verzeichnet werden. Auch hier zeigte sich ein geringer Einfluss der Endotoxine. Weiterhin werden exemplarisch die Ergebnisse für drei Gene gezeigt, die direkt mit dem NF- κ B Komplex assoziiert sind (Abb. 3.33). Es handelte sich hierbei um das NF- κ B Inhibitor-Protein *NFKBIA* sowie die I κ B-Kinasen *IKBKB* und *IKBKE*. Für die Expression des Gens für die Kinase *IKBKE* konnte ein deutlicher Anstieg in der mit IL-1 β behandelten Probe beobachtet werden, welcher in Verbindung mit 50 $\mu\text{g/mL}$ Diclofenac nicht mehr vorhanden war. Auch die Expression von *IKBKB* wurde in den mit den Pharmazeutika und IL-1 β behandelten Proben herunter reguliert. Bei *NFKBIA* zeigten sich keine relevanten Veränderungen.

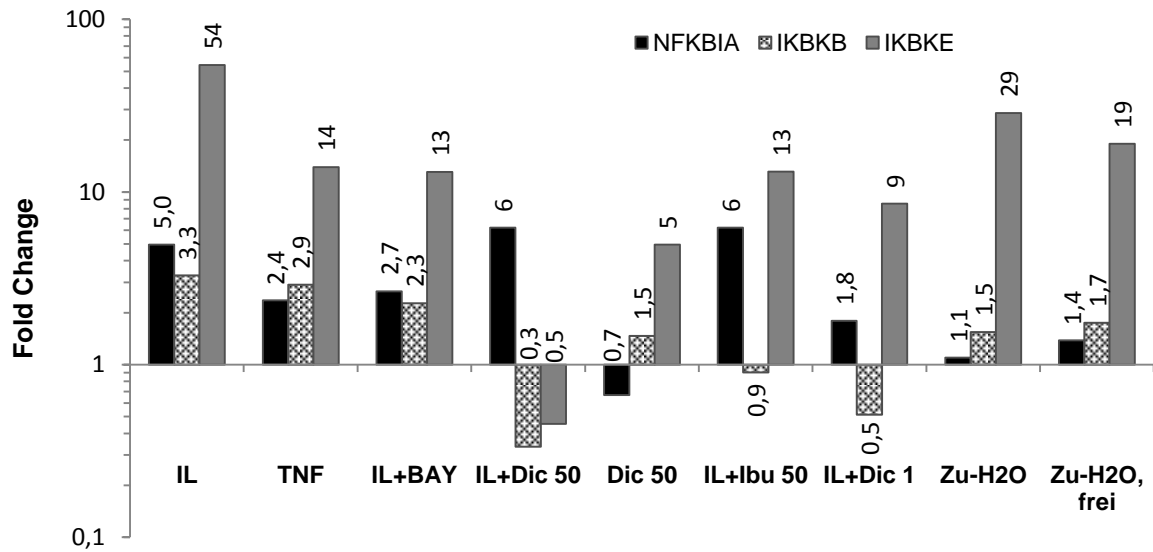


Abb. 3.33: Expression der Gene *NFKBIA*, *IKBKB* und *IKBKE* nach verschiedenen Behandlungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung
Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; (SF-DMEM = 1).

Alle Daten wurden ohne Standardabweichung dargestellt, da es sich jeweils um nur zwei biologische Replikate handelte und die Web-basierte Auswertungssoftware von SABiosciences™ erst ab drei Replikaten die Standardabweichungen ermittelt. Die *Fold Change* Werte für weitere Gene, die eine Veränderung der Expression für die verschiedenen Behandlungen zeigten, sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Die Ergebnisse des *Human NF-κB Signaling Pathway* Arrays zeichneten sich durch eine hohe Variabilität der Werte und somit durch Probleme bei der Bestimmung der Signifikanz aus. Da die Probenanzahl begrenzt war, konnten speziell mit diesem Kit keine weiterführenden Analysen durchgeführt werden, um beobachtete Effekte zu validieren.

Tab. 3.3: *Fold Change* ausgewählter Gene im Vergleich zur Kontrollbehandlung Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; rot = Gene die mehr als 3-fach hochreguliert wurden; blau = Gene, die mehr als 3-fach herunterreguliert wurden; (SF-DMEM = 1).

| | IL | TNF | IL+BAY | IL Dic 50 | Dic 50 | IL Ibu 50 | IL Dic 1 | Zu-H2O | Zu-H2O frei |
|----------------|--------|-------|--------|--------------|--------|--------------|-------------|--------|----------------|
| CFB | 24,08 | 6,48 | 9,22 | 11,67 | 0,15 | 8,43 | 2,25 | 3,48 | 2,6 |
| CCL2 | 25,11 | 7,41 | 7,65 | 7,59 | 0,1 | 9,75 | 1,68 | 1,18 | 0,63 |
| CSF2 | 77,17 | 9,48 | 9,78 | 110,66 | 3,46 | 100,78 | 25,99 | 2,26 | 2,58 |
| CSF3 | 2749,6 | 42,22 | 42,22 | 207,94 | 1,38 | 1978,2 | 165,42 | 2,26 | 2,58 |
| IL1A | 85,63 | 12,13 | 14,07 | 84,74 | 4,32 | 9,45 | 6,04 | 20,57 | 10,13 |
| IL1B | 97,34 | 8,49 | 16,45 | 6,43 | 5,62 | 2,65 | 6,8 | 11,69 | 8,06 |
| IRAK1 | 0,62 | 0,24 | 0,51 | 0,13 | 0,18 | 0,35 | 0,04 | 0,35 | 0,36 |
| IRAK2 | 8,94 | 1,08 | 3,45 | 2,06 | 0,77 | 3,18 | 1,34 | 2,54 | 2,17 |
| RELA | 1,63 | 0,74 | 0,96 | 1,63 | 0,37 | 0,82 | 0,19 | 0,83 | 1,18 |
| RELB | 12,42 | 1,91 | 5,94 | 2,41 | 0,44 | 0,35 | 0,53 | 4,77 | 1,79 |
| RHOA | 27,86 | 0,52 | 26,17 | 0,07 | 17,15 | 0,72 | 8,78 | 19,87 | 26,72 |
| TNF | 47,67 | 9,16 | 7,67 | 6,08 | 1,38 | 37,14 | 12,55 | 4,38 | 2,58 |
| TNFAIP3 | 35,38 | 11,51 | 12,86 | 12,86 | 0,48 | 24,25 | 16,8 | 5,34 | 3,38 |
| TNFSF14 | 8,91 | 4,98 | 6,21 | 2,69 | 0,75 | 8,63 | 4,96 | 4,78 | 7,24 |

Einige Ergebnisse der Proben mit Diclofenac und Ibuprofen waren auffällig, so dass weitere Untersuchungen notwendig waren. Es sollte der Einfluss ihrer Konzentration auf ausgewählte Gene untersucht und auch die nativen Wasserproben in die Untersuchungen einbezogen werden. Dazu wurden neben *IL-6* und *IKBKE* acht weitere Gene ausgewählt, deren Expression näher analysiert wurde.

3.3.2 RT² ProfilerTM PCR Array: Fokussierte Analyse von Diclofenac, Ibuprofen und nativen Wasserproben

Für die Analysen wurde bei der Firma SABiosciencesTM ein nach Kundenwunsch (*custom-made*) entwickelter PCR Array bestellt (s. 6.1.2). Die näher untersuchten Gene und deren Expression im NF- κ B Array sind in Tabelle 3.4 nochmals zusammengefasst. Als Haushaltsgene wurden hier ebenfalls *HPRT1* und *RPL13A* eingesetzt.

Tab. 3.4: Fold Change Werte der für den *custom-made* RT² PCR Array ausgewählten Gene im NF- κ B Signaling Pathway Array im Vergleich zur Kontrollbehandlung Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; rot = Gene die mehr als 2-fach hochreguliert wurden; blau = Gene, die mehr als 2-fach herunterreguliert wurden; (SF-DMEM = 1).

| | IL | TNF | IL+BAY | IL Dic 50 | Dic 50 | IL Ibu 50 | IL Dic 1 | Zu-H2O | Zu-H2O frei |
|-----------------|--------|-------|--------|--------------|--------|--------------|-------------|--------|----------------|
| <i>CASP8</i> | 1,11 | 0,44 | 0,93 | 0,13 | 0,19 | 0,85 | 0,13 | 0,07 | 0,24 |
| <i>SLC44A2</i> | 0,61 | 0,42 | 0,82 | 8,54 | 2,08 | 0,47 | 0,16 | 10,36 | 12,47 |
| <i>IKBKE</i> | 54,38 | 13,93 | 13,04 | 0,45 | 4,96 | 13,13 | 8,54 | 28,69 | 19,03 |
| <i>IL-6</i> | 117,78 | 13,83 | 30,80 | 45,10 | 1,35 | 85,33 | 17,81 | 2,48 | 1,39 |
| <i>MALT1</i> | 0,86 | 0,03 | 0,39 | 0,01 | 0,40 | 0,07 | 0,19 | 0,43 | 0,42 |
| <i>MAP3K1</i> | 4,87 | 1,13 | 1,33 | 0,05 | 8,14 | 0,69 | 3,88 | 13,43 | 12,55 |
| <i>TLR2</i> | 1,80 | 1,68 | 0,51 | 2,94 | 1,02 | 0,52 | 0,81 | 1,86 | 2,40 |
| <i>TLR6</i> | 11,47 | 8,94 | 10,13 | 0,51 | 7,06 | 1,06 | 5,12 | 14,55 | 22,86 |
| <i>TNFRSF1A</i> | 1,36 | 1,04 | 1,42 | 0,67 | 12,95 | 4,39 | 7,14 | 0,64 | 0,38 |
| <i>TICAM1</i> | 9,85 | 3,33 | 2,67 | 0,26 | 12,42 | 1,23 | 11,96 | 6,69 | 6,02 |

Der Auswahl der Gene lagen verschiedene Kriterien zugrunde. *CASP8* wurde als an der Apoptose und *MAP3K* als ein an einer weiteren Signalkaskade beteiligtes Gen gewählt. *MALT1* repräsentierte ein Gen, welches in allen Behandlungen herunter reguliert wurde. *SLC44A2*, *TNFRSF1A* und *TICAM1* zeigten unterschiedliche Expressionen für die zwei Diclofenac-Konzentrationen und *IL-6* und *IKBKE* dienten als Kontrollen stark herauf regulierter Gene bei Behandlung mit IL-1 β . *TLR2* und *TLR6* sind als Rezeptor-Dimere an der Erkennung einer Vielzahl verschiedener Liganden, darunter vieler Mikroorganismen-assoziiierter Strukturen, beteiligt [Medzhitov, 2001].

Die Konzentrationsabhängigkeit der Effekte durch die beiden Pharmazeutika Diclofenac und Ibuprofen wurde jeweils mit und ohne Stimulanzzugabe analysiert. Bei den Wasserproben wurden zudem das Kläranlagenablauf- und das Main-Wasser auf mögliche Effekte untersucht.

Als Kontrolle diente hier destilliertes Wasser. Einen Überblick der Proben gibt Tabelle 3.5. Von Diclofenac und Ibuprofen wurden Konzentrationsreihen hergestellt beginnend bei 50 µg/mL (K1) und anschließender neunmaliger Verdünnung um den Faktor 5, so dass die niedrigste Konzentration bei 25,6 pg/mL (K10) lag.

Tab. 3.5: Zusammenfassung der im *custom-made* RT² PCR Array untersuchten Behandlungen der A-549 Epithelzellen Bei K1 – K10 handelt es sich um die Konzentrationsreihen der Substanzen (K1 = 50 µg/mL; K10 = 25,6 pg/mL).

| Behandlung | Abkürzung |
|---------------------------------------|------------------|
| Kontrolle (SF-DMEM) | SF |
| IL-1β 5 ng/mL | IL |
| IL-1β 5 ng/mL und BAY 11-7082 1 µg/mL | IL + BAY |
| IL-1β 5 ng/mL und Diclofenac K1 – K10 | IL + Dic K1-K10 |
| Diclofenac K1 – K10 | Dic K1-K10 |
| IL-1β 5 ng/mL und Ibuprofen K1 – K10 | IL + Ibu K1-K10 |
| Ibuprofen K1 – K10 | Ibu K1-K10 |
| Destilliertes Wasser 1:2 | dest. H2O 1:2 |
| Destilliertes Wasser 1:4 | dest. H2O 1:4 |
| Zulauf-Wasser 1:2 | Zu-H2O 1:2 |
| Zulauf-Wasser 1:4 | Zu-H2O 1:4 |
| Zulauf-Wasser, endotoxin-frei 1:2 | Zu-H2O, frei 1:2 |
| Zulauf-Wasser, endotoxin-frei 1:4 | Zu-H2O, frei 1:4 |
| Ablauf-Wasser 1:2 | Ab-H2O 1:2 |
| Ablauf-Wasser 1:4 | Ab-H2O 1:4 |
| Main-Wasser 1:2 | Main 1:2 |
| Main-Wasser 1:4 | Main 1:4 |

Die Ergebnisse wurden auf die gleiche Weise ausgewertet. Bei den Proben der Kontrolle (SF-DMEM) gab es jedoch zu viele Daten, die nicht auswertbar waren. Hier wurde kein oder nur ein sehr spätes Signal, d. h. nach mehr als 35 Zyklen, bei der RT-PCR detektiert (s. CP-Werte im Anhang 6.2.2). Würden die Daten der einzelnen Behandlungen dann auf diese hohen Werte bezogen, ergäbe sich für den *Fold Change* ein falsches Bild. Es könnten sich z. B. bei einigen Proben vermeintlich starke Heraufregulationen zeigen, die aber bei Betrachtung und Vergleich der Rohdaten nicht signifikant sind. Daher erfolgte die Auswertung für die

Pharmazeutika-Behandlungen speziell nur für die mit IL-1 β stimulierten Proben. Dafür wurde als Kontrolle die Behandlung mit IL-1 β allein herangezogen. Bei den Wasserproben wurden nach Normalisierung auf die beiden Haushaltsgene alle Werte auf die Ergebnisse mit destilliertem Wasser bezogen. Aus den Analysen ausgeschlossen wurde außerdem das Gen für *TLR2*, welches in allen Behandlungen keine Expression zeigte und somit davon ausgegangen werden musste, dass die A-549 Zellen den Rezeptor nicht exprimieren. Zusätzlich durchgeführte FACS-Analysen zum Nachweis des Rezeptors auf der Zelloberfläche konnten diese Ergebnisse bestätigen (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.34 zeigt den *Fold Change* bei Behandlung der stimulierten Zellen mit Diclofenac und Ibuprofen bezogen auf die Positivkontrolle (5 ng/mL IL-1 β). Für beide Substanzen waren keine konzentrationsabhängigen Veränderungen der Expressionsmuster zu beobachten. Die zusätzliche Inkubation mit den beiden Pharmazeutika hatte auf die nach der Stimulation mit IL-1 β ablaufenden Prozesse keinen signifikanten Einfluss. Es wurde außerdem festgestellt, dass alle CP-Werte des *custom-made* RT² PCR Array sehr hoch waren. Durch die internen Kontrollen, die durch den Hersteller angeboten wurden, konnte aber davon ausgegangen werden, dass die RT-PCR *per se* funktioniert hatte, zumal auch die beiden Haushaltsgene für alle Behandlungen auswertbare Daten lieferten. Die für die nativen Wasserproben ermittelten Werte für den *Fold Change* sind in Abbildung 3.35 dargestellt. Auch hier zeigten sich keine Effekte, die auf eine Wirkung des Wassers zurückzuführen wären. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die ausgewählten Gene für die Untersuchungen in den A-549 Epithelzellen nicht geeignet waren. Für kein Gen konnte eine Korrelation mit der jeweiligen Behandlung hergestellt werden.

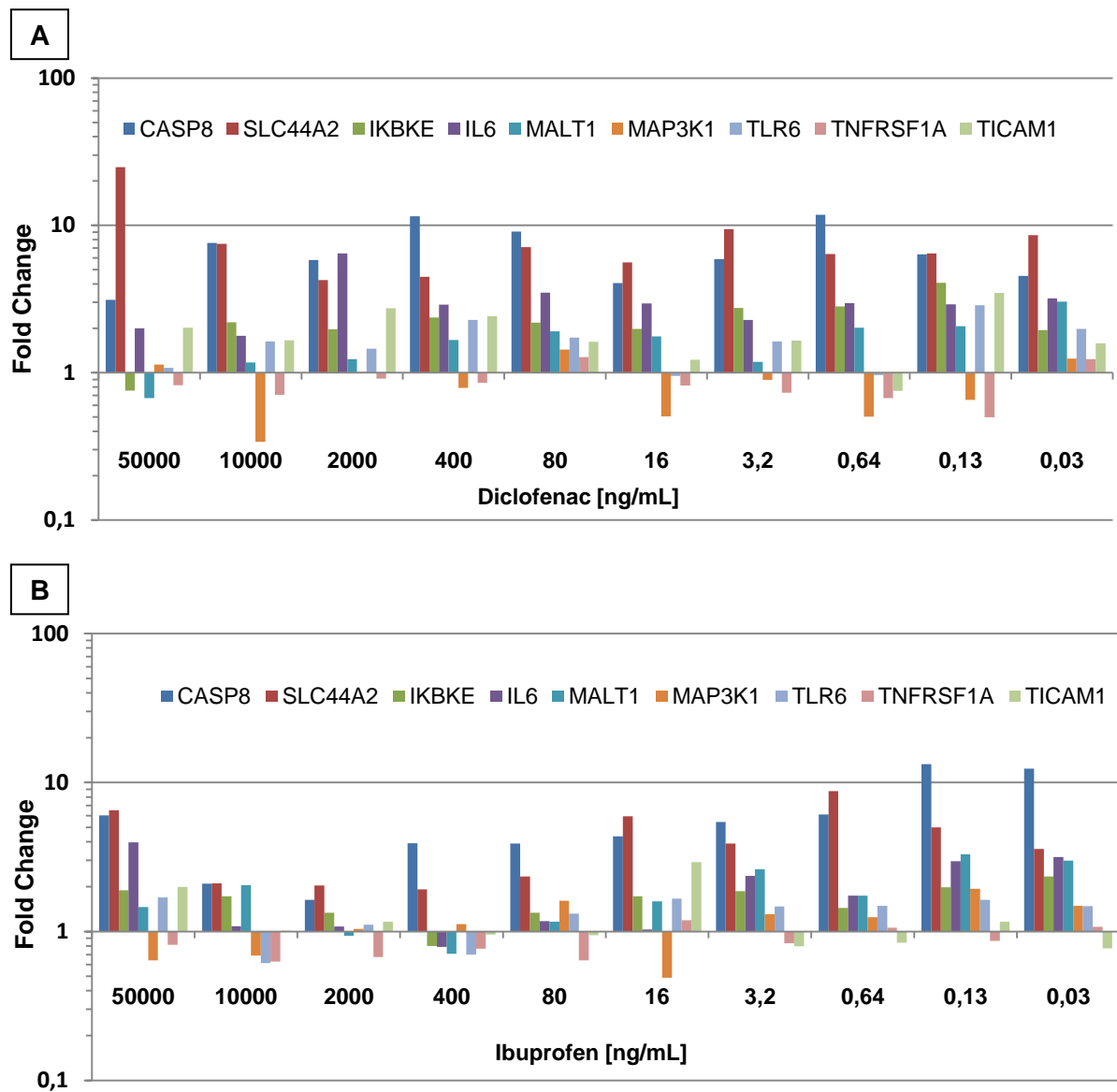


Abb. 3.34: Expression der ausgewählten Gene in A-549 Zellen bei Behandlung mit IL-1 β und den angegebenen (A) Diclofenac- und (B) Ibuprofen-Konzentrationen Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; (IL-1 β = 1).

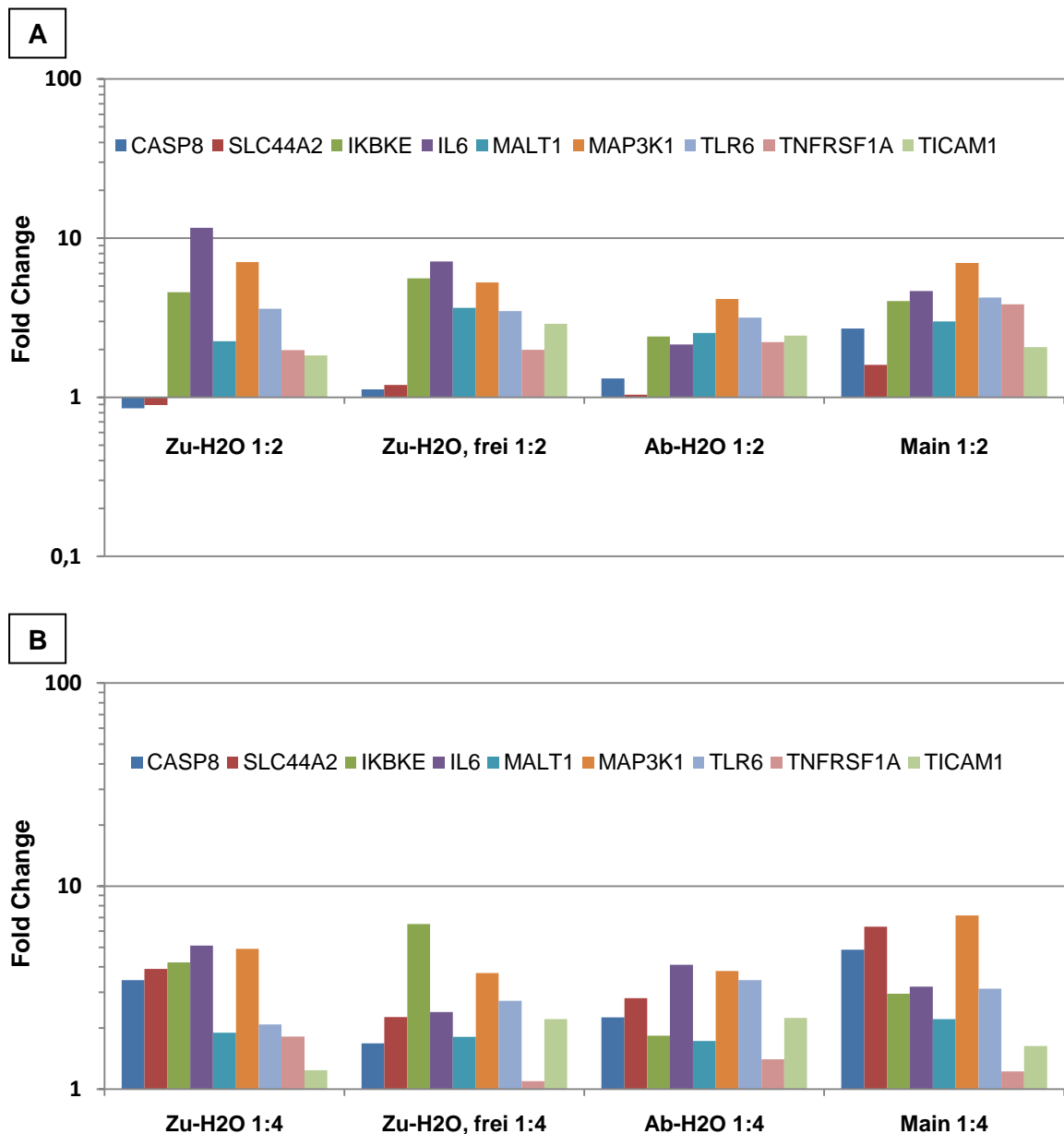


Abb. 3.35: Expression der ausgewählten Gene nach Behandlung der A-549 Zellen mit (A) 1:2- und (B) 1:4-Verdünnungen der nativen Wasserproben im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Dargestellt sind die Daten der CP-Mittelwerte von 2 unabhängigen Experimenten; (dest. H₂O 1:2 (A) bzw. 1:4 (B) = 1).

4 DISKUSSION

4.1 Entwicklung und Etablierung der Testsysteme

Um schädigende Wirkungen von im Wasserkreislauf vorkommenden Substanzen nachzuweisen, gibt es eine Reihe verschiedener Systeme, deren Basis zumeist Organismen aus der aquatischen Umwelt bilden (s. 1.3). Besonders im Hinblick auf die Diversität der gefundenen Substanzklassen und deren Wirkweisen wurden in den letzten Jahren vermehrt Systeme entwickelt, die sich auf Versuche mit tierischen Zellen in Kultur stützen. Dazu gehören z. B. die CALUX[®] Assays aber auch die Toxizitätstests mit etablierten Fischzelllinien. Im Zuge der Chemikalienverordnung REACH ist eine immense Zahl von Chemikalien auch toxikologisch neu zu bewerten, was eine hohe Zahl von Tierversuchen erfordert. Ziel dieser Doktorarbeit war daher die Entwicklung von neuen Testsystemen, die als Grundlage am Immunsystem des Organismus beteiligte Zellen besitzen und mit denen spezifischere Wirkungen von Substanzen nachgewiesen werden können als unspezifische letale Effekte. Es wurden in erster Linie die in Wasseranalysen detektierten Pharmazeutika berücksichtigt.

4.1.1 Physiologische Zellantworten

Die am häufigsten in der Umwelt gefundenen pharmazeutischen Substanzen gehören zur Gruppe der nichtsteroidalen antiinflammatorischen Wirkstoffe (NSAID). Als Grundlage für die Testsysteme wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gewählt, dem eine entscheidende Rolle bei Entzündungsreaktionen sowie der Bekämpfung von eingedrungenen fremden Partikeln zukommt. Als zelluläre Basis wurden Zelltypen herangezogen, welche im Gesamtorganismus eine Rolle bei Immun- und Entzündungsreaktionen spielen. Zum einen handelte sich dabei um die murine Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7, deren Aufgabe in der Phagozytose und anschließendem Abbau eindringender Partikel besteht. Durch die Erkennung der Fremdstoffe wird gleichzeitig die Produktion von Botenstoffen induziert, die wiederum in der Lage sind, andere Zellen zu aktivieren. Die RAW 264.7 Zellen können jedoch auch ohne Phagozytose zu einer inflammatorischen Reaktion angeregt werden, indem man z. B. mit LPS, einem Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, eine Infektion simuliert. Die dadurch ausgelöste NF- κ B Signalkaskade führt in diesen Zellen u. a. zur Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), deren Aktivität indirekt über das in das Medium abgegebene NO, welches dann zu Nitrit reagiert, bestimmt werden kann. Diese

Reaktion der Zellen wird in vielen Arbeiten erfolgreich zum Nachweis einer Aktivierung des NF- κ B Transkriptionsfaktors angewandt [Jones *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007]. Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte NO zuverlässig als Antwort der Zellen auf die Stimulation mit LPS detektiert werden. Zudem wurde die Beteiligung von NF- κ B durch die Anwendung eines entsprechenden Inhibitors (BAY 11-7082) und den Nachweis der Phosphorylierung der I κ B-Kinase (IKK α) innerhalb der NF- κ B Signalkaskade gezeigt (Abb. 3.1 und 3.4). Daher diente dieses System als eine Grundlage zum Nachweis von möglichen Wirkungen der Pharmazeutika auf die zellulären Abläufe, die in den Makrophagen mit der NF- κ B Aktivierung assoziiert sind.

Zum anderen wurden humane Lungenepithelzellen (A-549) verwendet. Epithelzellen sind an der Immunabwehr beteiligt, weil sie eine mechanische Barriere für eindringende Partikel darstellen. Auch diese Zellen sind in der Lage, eine Immunantwort auszulösen, wobei die Hauptaufgabe in der Erkennung von durch andere Zellen abgegebenen interzellulären Botenstoffen wie Zytokinen liegt [Bals & Hiemstra, 2004]. Diese haben eine Aktivierung der Epithelzellen zur Folge und regen sie zur Produktion von Zytokinen an, welche dann z. B. Makrophagen chemotaktisch zum Infektions- bzw. Entzündungsherd locken. Die A-549 Zellen haben daher eine andere physiologische Funktion, die hauptsächlich in der interzellulären Kommunikation und nicht in der direkten Eliminierung des Pathogens oder eindringender Partikel liegt. Auch in den A-549 Zellen kann eine Entzündungsreaktion simuliert werden. Durch die Inkubation mit proinflammatorischen Botenstoffen, beispielsweise dem Zytokin IL-1 β , werden die Zellen aktiviert und intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst. Dadurch kommt es zur Aktivierung von NF- κ B, was zur Produktion weiterer Zytokine (u. a. IL-6) und Chemokine (IL-8) führt. Dies konnte in den Untersuchungen mit den A-549 Zellen auf ihre physiologische Funktion bestätigt werden. Die Zellen zeigten nach Stimulation sowohl eine Phosphorylierung der IKK α als auch eine Translokation des NF- κ B Proteins p65 in den Zellkern (Abb. 3.1 und 3.2). Die Botenstoffe IL-6 und IL-8 sollten in diesem System als zu messende Parameter dienen. Für beide Interleukine konnte eine deutliche Produktion nach Stimulation mit IL-1 β verzeichnet werden, wobei die IL-6 Produktion signifikant mit Hilfe des NF- κ B Inhibitors BAY 11-7082 unterdrückt werden konnte (s. Abb. 3.5A). Bei der IL-8 Produktion konnte diese Reduktion jedoch nicht beobachtet werden. Zudem war eine deutliche IL-8 Sekretion bereits nach 6 h Inkubation mit IL-1 β zu detektieren (s. Abb. 3.5B). Beide Faktoren deuten neben der Abhängigkeit von NF- κ B auf einen weiteren Regulationsmechanismus hin. Dieser liegt nicht auf der Ebene der Transkription sondern beruht auf einer Stabilisierung der mRNA, welche

dann nicht mehr durch eine Inhibition von NF- κ B zu beeinflussen ist [Winzen *et al.*, 1999]. Für den Einsatz der A-549 Epithelzellen als Testsystem wurden daher immer beide Zytokine bestimmt. Nachdem für beide Zelllinien die Parameter ausgewählt und validiert wurden, konnten die Zellen als Basis für die Analysen von möglichen inhibierenden Wirkungen der zu testenden Substanzen eingesetzt werden.

4.1.2 Analytische Zellantwort mittels Reporterzellsystem

Zusätzlich zu den physiologischen Antworten der Zellen wurde ein Reportersystem entwickelt, das dem Prinzip der CALUX[®] Bioassays ähnelt. Diese basieren auf genetisch modifizierten Zellen, die spezifisch die Anwesenheit von Substanzen mit endokriner Wirkung anzeigen können [Sonneveld *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die A-549 Epithelzellen stabil transfiziert, jedoch um ein Reportersystem zu etablieren, welches in der Lage ist, die Aktivierung von NF- κ B anzuzeigen. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Plasmid verwendet, welches eine artifizielle Sequenz des NF- κ B Promotormotifs (5x ELAM) gekoppelt an eine sekretorische embryonische alkalische Phosphatase als Reporterprotein enthält. Es konnte dann das Maß der NF- κ B Aktivierung über die Aktivität der Phosphatase bestimmt werden. Anders als bei den CALUX[®] Assays kann nicht nur die Aktivierung des Transkriptionsfaktors sondern auch die Hemmung einer Stimulation detektiert werden. Die stabile Transfektion der Zellen erfolgte mit Hilfe eines Selektionsmarkers, dessen Sequenz sich auch auf dem Plasmid befand. Alle Zellen, die das Plasmid stabil in das Genom integriert hatten, waren resistent gegen das im Kulturmedium enthaltene Antibiotikum Zeocin. Da die Integration der Plasmid-DNA nicht an einer spezifischen Stelle im Genom stattfand, musste eine Einzelzellklonierung vorgenommen werden. Dadurch wurde gewährleistet, dass alle Zellen den gleichen genetischen Hintergrund hatten und das Reportersignal nicht vom Integrationsort des Plasmids beeinflusst wurde. Eine Mischpopulation von Zellen könnte z. B. ein sehr variables Reportersignal generieren, da einige Zellen möglicherweise das Plasmid in eine Genomregion mit hoher transkriptioneller Aktivität integriert hatten und bei anderen Zellen eine Integration in Regionen mit niedriger Expressionsrate stattgefunden hatte. Die Gewinnung von Einzelzellklonen erfolgte mit Hilfe der *Limited Dilution* Methode, bei der die Zellen stark vereinzelt ausgesät werden, wobei aus einzelnen Zellen Klone hervorgehen, die dann entsprechend weiterkultiviert und auf ihre Funktionalität untersucht werden können. Der erhaltene Klon 1A11 wurde nach ersten Analysen für einen Funktionstest ausgewählt. Dieser Test orientierte sich bei der Art der Stimulation an der physiologischen Reaktion der A-549 Zellen. Für die Aktivierung von NF- κ B wurde hier ebenfalls die Stimulation mit IL-1 β

eingesetzt. Zudem wurde ein weiteres Stimulanz getestet, da aus der Literatur bereits Reportersysteme bekannt waren, die mit Hilfe von TNF- α als Stimulanz für Analysen von Pharmazeutika-Wirkungen eingesetzt wurden [Takada *et al.*, 2004]. Für die beiden Stimulanzen konnte in den 1A11 Zellen eine konzentrationsabhängige Sensitivität des Reporters beobachtet werden (Abb. 3.26). Die Signalkaskaden von IL-1 β und TNF- α unterscheiden sich in den A-549 Zellen zunächst durch die unterschiedlichen Rezeptoren und durch die damit verbundenen aktivierten Proteine am Beginn der Signalkaskade [Gururaja *et al.*, 2007]. Um einen Vergleich mit den physiologischen Antworten der A-549 Zellen zu erhalten und eine Variation innerhalb der Signalkaskade und einer damit eventuell verbundenen Veränderung des Reportersignals bei Anwendung von TNF- α zu vermeiden, wurde für die Analysen mit dem Reportersystem nur IL-1 β als Stimulanz verwendet. Die weitere Validierung des Systems erfolgte auch hier über den Einsatz bekannter NF- κ B Inhibitoren. Jedoch konnte mit BAY 11-7082 keine Inhibition des Reportersignals detektiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der starke artifizielle Promotor des Plasmids sein. In den physiologischen Systemen konnte mit BAY 11-7082 keine vollständige Inhibierung erreicht werden, so dass bei Anwendung dieses Inhibitors eine Restaktivität von NF- κ B bestehen bleibt, welche möglicherweise für eine vollständige Aktivierung der Reporterexpression ausreichend ist. Um zu gewährleisten, dass das Reportersignal prinzipiell inhibiert werden konnte, wurde ein weiterer NF- κ B Inhibitor in die Analysen mit einbezogen. Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC), eine antioxidative Substanz mit einem hohen Potential, die NF- κ B Aktivierung zu unterdrücken [Schreck *et al.*, 1992], wurde daraufhin auf seine Wirkung auf die 1A11 Reporterzellen getestet. Es konnte eine vollständige Inhibition der Reporteraktivität erreicht werden, ohne dass eine toxische Wirkung der Substanz zu verzeichnen war. Die hohe Empfindlichkeit des Promotors und die unterschiedliche Antwort der beiden NF- κ B Inhibitoren müssen daher in Interpretationen der erhaltenen Ergebnisse einfließen, z. B. durch die Betrachtung und den Vergleich der Rohdaten verschiedener Experimente. Da eine grundlegende Funktionalität dieses Reporterzellsystems gegeben war, wurden alle Analysen mit dem Klon 1A11 durchgeführt.

4.2 Effekte verschiedener Pharmazeutika auf die Testsysteme

4.2.1 Wirkweise einzelner Pharmazeutika auf die untersuchten Parameter

In dieser Arbeit wurden insgesamt 10 verschiedene Pharmazeutika hinsichtlich ihrer Wirkung auf den NF- κ B Signalweg untersucht. Die Auswahl erfolgte nicht anhand spezieller Kriterien, sondern orientierte sich hauptsächlich an Literaturrecherchen, denen Ergebnisse aus der Wasseranalytik zugrunde lagen [Daughton & Ternes 1999; Fent *et al.*, 2006; Nikolaou *et al.* 2007]. Zu den ausgewählten Stoffen gehörten die nichtsteroidalen antiinflammatorischen Substanzen (NSAID) Acetylsalicylsäure, Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen, die Lipidsenker Bezafibrat und Clofibrinsäure, das Anti-Epileptikum Carbamazepin, das Zytostatikum Cyclophosphamid, der β_1 -Adrenozeptorenblocker Metoprolol sowie das Antibiotikum Sulfamethoxazol. Dabei zeigten 6 der ausgewählten Pharmazeutika in keinem der verwendeten Testsysteme einen Effekt auf den NF- κ B Signalweg (Acetylsalicylsäure, Naproxen, Clofibrinsäure, Cyclophosphamid, Metoprolol und Sulfamethoxazol). Während Carbamazepin, Diclofenac und Ibuprofen jeweils eine die NF- κ B Aktivierung inhibierende Wirkung zeigten, war bei Bezafibrat ein zusätzlich stimulierender Effekt zu beobachten. Im Folgenden werden nur die Ergebnisse dieser vier Substanzen diskutiert.

4.2.1.1 Bezafibrat

Bezafibrat zeigte nur in der IL-6 Produktion der A-549 Zellen einen zusätzlich zur IL-1 β Behandlung stimulierenden Effekt bei einer Konzentration von 50 μ g/mL bis 25 μ g/mL (Abb. 3.12B). Bezafibrat wird zur Senkung des Triglyceridspiegels im Blut eingesetzt. Der Wirkmechanismus der Fibrate liegt in der Bindung und Aktivierung der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) [Steinhilber & Schubert-Zsilavecz, 2007]. Bei den PPAR handelt es sich um nukleare Fettsäure-Rezeptoren, die nach Bindung des Liganden als Transkriptionsfaktoren an die DNA binden können und so für die Homöostase des Fettsäurestoffwechsels durch die Aktivierung von z. B. Lipasen verantwortlich sind [Lee *et al.*, 2003]. Es gibt drei verschiedene Subtypen der PPAR (PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ), die alle von Bezafibrat aktiviert werden können [Steinhilber & Schubert-Zsilavecz, 2007]. Die zusätzliche Aktivitätssteigerung des NF- κ B Signalwegs bei Behandlung der A-549 Zellen mit IL-1 β und Bezafibrat könnte durch einen sogenannten *Cross-Talk* oder eine Interaktion der beiden Transkriptionsfaktoren verursacht werden, da der Effekt nur bei gleichzeitiger Gabe des Stimulanz und somit der Aktivierung von NF- κ B stattfand. In der

Literatur ist jedoch hauptsächlich eine inhibierende Wirkung der PPAR auf NF- κ B beschrieben. So konnte z. B. in humanen Glattmuskelzellen für PPAR α eine Inhibition der durch IL-1 induzierten IL-6 Produktion nachgewiesen werden [De Bosscher *et al.*, 2006]. Auch in weiteren Experimenten zeigte die Aktivierung der PPAR eher antiinflammatorische Effekte. Der in den A-549 Zellen auftretende zusätzlich stimulierende Effekt auf die IL-6 Produktion kann daher nicht vollständig geklärt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daher auf eine andere Art der Wechselwirkung hin, welche jedoch in weiteren Experimenten genauer analysiert und validiert werden müsste.

4.2.1.2 Carbamazepin

Das Anti-Epileptikum Carbamazepin zeigte in allen drei verwendeten Testsystemen eine deutliche Inhibition des NF- κ B Signalwegs, da die Konzentrationen aller Indikatoren reduziert wurden (Abb. 3.10, 3.12A, 3.13 und 3.29). Jeweils bis hinab zu einer Konzentration von 62,5 μ g/mL konnte dieser Toxizitäts-unabhängige Effekt beobachtet werden. Carbamazepin blockiert vorwiegend spannungsabhängige Natriumkanäle in neuronalen Zellen [Mutschler *et al.*, 2008]. Ichiyama *et al.* zeigten 2000, dass Valproat, ein Anti-Epileptikum, dessen Wirkweise teilweise mit der von Carbamazepin übereinstimmt, in der Lage ist, die IL-6 Produktion in humanen monozytischen Zellen zu inhibieren. Der genaue Wirkmechanismus konnte jedoch nicht geklärt werden, wobei ein Effekt auf die Translokation oder die DNA-Bindung von NF- κ B vermutet wurde. Eine weitere Studie zeigte zudem eine Beteiligung von NF- κ B an epileptischen Anfällen [Lubin *et al.*, 2007]. Durch diese komplexe Rolle von NF- κ B auch bei Vorgängen in neuronalen Zellen ist eine Inhibition durch entsprechende Anti-Epileptika möglich. Der in dieser Arbeit beobachtete Effekt von Carbamazepin auf den NF- κ B Signalweg in Epithelzellen und Makrophagen deutet auf eine nicht über die Ionenkanäle vermittelte Wirkung des Wirkstoffs hin und zeigt wiederum die ubiquitäre Rolle von NF- κ B in zellulären Prozessen. Auch hier müssten weitere Experimente zur genauen Aufklärung und Einstufung des Effekts als potentielle Nebenwirkung durchgeführt werden.

4.2.1.3 Diclofenac und Ibuprofen

Die zu den nichtsteroidalen Entzündungshemmern (Antiphlogistika) gehörenden Wirkstoffe Diclofenac und Ibuprofen sind durch ihre weit verbreitete Anwendung in der humanen Schmerztherapie für Umweltanalysen von großer Bedeutung. Der Wirkmechanismus der Substanzen beruht auf einem Eingriff in die Prostaglandin-Biosynthese durch Hemmung der Cyclooxygenasen [Vane & Botting, 1995]. Bei diesen Substanzen besteht im Gegensatz zu

Bezafibrat und Carbamazepin ein direkter Zusammenhang mit dem NF- κ B Signalweg. Die induzierbare Cyclooxygenase-2 (COX-2), deren Hemmung die wesentliche Grundlage der pharmazeutischen Wirkung ist, gehört zu den Zielgenen, deren Expression durch eine Aktivierung des NF- κ B Signalwegs induziert wird [Pahl, 1999]. Abbildung 4.1 zeigt die durch Lipopolysaccharid (LPS) vermittelte Entzündungsreaktion und die dadurch ausgelöste NF- κ B Signalkaskade mit anschließender Aktivierung der COX-2 Expression.

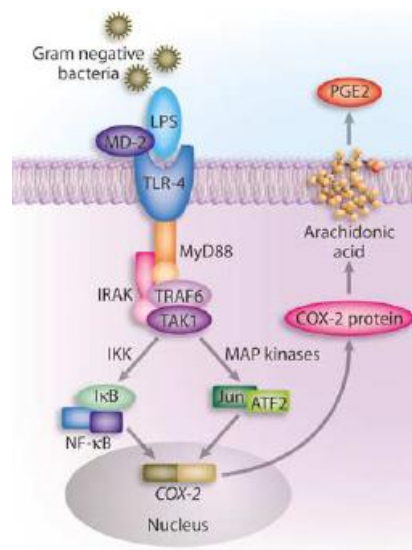


Abb. 4.1: Beteiligung von NF- κ B an der COX-2 Genexpression
[Fukata & Abreu, 2008]

Trotz ihrer pharmakologischen Wirkung auf die Cyclooxygenase, die kein direkter Bestandteil der eigentlichen Signaltransduktionskaskade ist, konnte für Diclofenac und Ibuprofen in dieser Arbeit ein inhibierender Effekt auf den NF- κ B Signalweg beobachtet werden. In den RAW 264.7 Makrophagen konnte mit einer Ibuprofen-Konzentration von 250 μ g/mL bis 62,5 μ g/mL eine Reduktion der NO-Produktion auf 20 % bzw. 80 % Natriumnitrit im Vergleich zu nur mit LPS als Stimulanz behandelten Zellen detektiert werden (Abb. 3.11). Diclofenac führte zu einem noch deutlicheren Rückgang der NO-Produktion. Hier wurde bei einer Konzentration von 62,5 μ g/mL eine Reduktion um 40 % beobachtet. Die Interleukin-Produktion in den A-549 Zellen sowie die Reporterexpression in den 1A11 Zellen wurde nur durch Diclofenac beeinflusst. Hier konnte z. B. bei einer Konzentration von 62,5 μ g/mL ein Rückgang der gemessenen Parameter um 20 % verzeichnet werden (Abb. 3.12A, 3.13 und 3.29). Studien, die mittels einer TNF- α induzierten NF- κ B abhängigen Reporterexpression durchgeführt wurden, zeigten, dass die NSAID unabhängig von COX-2 NF- κ B inhibieren können [Takada *et al.*, 2004]. Im Rahmen dieser

Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch die IL-1 β induzierte NF- κ B Aktivierung in den untersuchten Zelllinien beeinflusst werden kann. Beide Stimulanzen aktivieren NF- κ B über die Aktivierung des IKK-Komplexes, unterscheiden sich jedoch am Anfang der Reaktionskaskade durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die daran gekoppelten intrazellulären Adaptorproteine [Gururaja *et al.*, 2007]. Dies deutet daraufhin, dass eine Beeinflussung durch die Substanzen auf der NF- κ B spezifischen Ebene des Signalwegs, d. h. ab der Phosphorylierung des IKK-Komplexes, stattfinden kann und somit neben den bekannten Nebenwirkungen, die zumeist durch die Hemmung der konstitutiv exprimierten COX-1 hervorgerufen werden [Mutschler *et al.*, 2008], auch weitere unerwünschte Wirkungen denkbar sind.

4.2.2 Wirkweise eines Pharmazeutika-Gemisches auf die untersuchten Parameter

In der Umwelt kommen die untersuchten Pharmazeutika nicht einzeln vor, sondern liegen in komplexen Gemischen vor, deren genaue Zusammensetzung variabel ist. Um die Testbedingungen teilweise an die realen Bedingungen anzupassen, kam in dieser Arbeit ein Gemisch der untersuchten Pharmazeutika (mit Ausnahme von Sulfamethoxazol) zum Einsatz. Dieses wurde im Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie mit einer Konzentration der einzelnen Substanzen von jeweils 10 μ g/mL angesetzt. Für die Experimente wurde der Pharmazeutika-Mix in verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt, beginnend mit einer Verdünnung um den Faktor 2. Das bedeutet, die Pharmazeutika waren nur noch in Konzentrationen von maximal 5 μ g/mL im entsprechenden Ansatz vorhanden. Lediglich die A-549 Zellen zeigten eine leichte Reduktion der IL-8 Produktion (Abb. 3.17), die jedoch durch die anderen Parameter (NO, IL-6 und SEAP) nicht bestätigt werden konnte. Daher ist anzunehmen, dass der Pharmazeutika-Mix keine spezifischen Effekte auf den NF- κ B Signalweg auslöste. Die eingesetzte Konzentration der Substanzen war hier auch deutlich geringer als in den Analysen der einzelnen Pharmazeutika, womit eine Toxizität komplett ausgeschlossen werden konnte, jedoch keine Möglichkeit gegeben war, eventuell auftretende synergistische Effekte zu beobachten.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass nur ein kleiner Teil der untersuchten Pharmazeutika in den verwendeten Testsystemen eine den NF- κ B Signalweg beeinflussende Wirkung zeigte, die jedoch bei einem Gemisch mit niedrigeren Konzentrationen nicht mehr zu verzeichnen waren. Da die aufgetretenen Effekte jedoch gut mit Literaturangaben korreliert werden

konnten, ist davon auszugehen, dass die hier entwickelten Testsysteme als Grundlage zum Nachweis unerwünschter Wirkungen von Substanzen durchaus geeignet sind. Daher wurden native Wasserproben auf ihre Effekte hin untersucht.

4.3 Effekte nativer Wasserproben auf die Testsysteme

Es kamen drei unterschiedliche Wasserproben für die Analysen in den Testsystemen zum Einsatz. Im Klärwerk Steinhof in Braunschweig wurden Proben vom Zulauf und Ablauf des Klärwerks genommen, die jeweils durch Filtration von Schwebstoffen befreit wurden und für den Einsatz in der Zellkultur steril filtriert wurden. Aus der Arbeitsgruppe von Dr. Michael Radke (Lehrstuhl für Hydrologie, Universität Bayreuth) wurden freundlicherweise Proben aus dem Roten Main bei Bayreuth zur Verfügung gestellt. Auch diese Proben wurden entsprechend für die Zellkultur aufbereitet. Die Analysen der Wasserproben wurden in zwei verschiedenen Ansätzen durchgeführt. Zum einen wurde das Wasser in verschiedenen Verdünnungen zu den Versuchsansätzen gegeben, zum anderen wurde aus dem Braunschweiger Kläranlagenzulauf und -ablauf das für die beiden Zelllinien RAW 264.7 und A-549 benötigte Kulturmedium hergestellt.

4.3.1 Analyse des Kläranlagen- und des Main-Wassers

Die Wasserproben wurden in allen drei Testsystemen (RAW 264.7, A-549 und 1A11) jeweils mit und ohne das entsprechende Stimulanz hinsichtlich ihrer Wirkung auf die untersuchten Parameter getestet. Dabei zeigte sich zunächst, dass eine Verdünnung des Kulturmediums um den Faktor 2 zu einer Reduktion der gemessenen Parameter führte. Dies konnte aber auf die Verdünnungseffekte und nicht auf Bestandteile im Wasser zurückgeführt werden, da bei den mit destilliertem Wasser behandelten Kontrollzellen derselbe Effekt beobachtet wurde. Zudem konnte keine Toxizität detektiert werden, so dass die Inhibierung der NO- bzw. Zytokin-Produktion tatsächlich aufgrund der reduzierten Nährstoffkonzentration stattfand. Unabhängig davon konnte kein weiterer Einfluss auf die stimulierten Zellen beobachtet werden.

Ein anderer Effekt zeigte sich jedoch hauptsächlich in den RAW 264.7 Makrophagen. Die Zellen produzierten allein durch die Anwesenheit des Wassers Stickstoffmonoxid (NO), welches im Fall des Zulauf-Wassers einen Anstieg nahezu bis auf das Niveau der mit LPS behandelten Positivkontrolle zeigte (Abb. 3.19). Aber auch das Ablauf und das Main-Wasser waren in der Lage, die NO-Produktion zu aktivieren, wenn auch sehr viel schwächer. Hier lag die Natriumnitritkonzentration bei 20 – 30 % im Vergleich zur Positivkontrolle. Die

Epithelzellen zeigten weder eine starke Beeinträchtigung der IL-Produktion noch der Reporterproteinexpression. Hier konnte ohne IL-1 β Stimulation nur ein leichter Anstieg (20 %) der IL-6 Konzentration bei Zugabe des Zulauf-Wassers detektiert werden (Abb. 3.20). Die Effekte in den 1A11 Reporterzellen waren zu vernachlässigen (Abb. 3.31). Um diese Ergebnisse genauer zu analysieren, wurden daher hauptsächlich die Makrophagen verwendet. Zunächst wurde geprüft, ob die Zellen weiterhin eine Inhibition der LPS-induzierten NO-Produktion zeigten, wenn das Nährstoffangebot nicht um die Hälfte reduziert wird. Dazu wurde aus dem Zulauf- und dem Ablauf-Wasser das entsprechende Kulturmedium für die Zellen hergestellt. Die inhibitorischen Effekte waren bei Anwendung dieser Medien nicht mehr zu beobachten (Abb. 3.21). Die aktivierende Wirkung dieser Medien überstieg jedoch noch jene der reinen Wasserproben (Abb. 3.22). Hier lag die NO-Produktion bei Zugabe des Zulauf-DMEM auch in der höchsten Verdünnung noch auf dem Niveau der Positivkontrolle. Das Ablauf-DMEM zeigte einen schwächeren Effekt, bewirkte aber in der Verdünnung um den Faktor 2 eine NO-Produktion von 50 % im Vergleich zur mit LPS behandelten Probe. Da in den vorangegangenen Experimenten die Pharmazeutika als Ursache ausgeschlossen werden konnten, mussten weitere Wasserinhaltsstoffe für die aktivierende Wirkung verantwortlich sein. Unter den in der aquatischen Umwelt vorliegenden Substanzen anthropogenen Ursprungs befinden sich nicht nur Pharmazeutika sondern auch Stoffe aus der landwirtschaftlichen Anwendung, z. B. Pestizide [Richardson, 2007]. Des Weiteren ist bekannt, dass Pestizide wie DDT Wirkungen auf das Immunsystem in Form von histopathologischen Veränderungen oder Störungen der Zellfunktion ausüben können [Voccia *et al.*, 1999]. Um zu klären, ob die Effekte des Wassers auf eine Substanz aus der Gruppe der Pestizide zurückzuführen ist, wurde Methoxychlor, ein DDT-Analogon, in Experimenten zur NO-Produktion der RAW 264.7 Makrophagen eingesetzt. Für Methoxychlor war eine LPS-unabhängige Stimulation der NO-Produktion und auch proinflammatorischer Zytokine beschrieben worden [Kim *et al.*, 2005]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Effekt für Methoxychlor jedoch nicht bestätigt werden. Die RAW 264.7 Zellen zeigten weder eine Inhibition der NO-Produktion bei gleichzeitiger Behandlung mit LPS und Methoxychlor, noch war eine Aktivierung durch die alleinige Zugabe von Methoxychlor zu detektieren (Abb. 3.23). Da in den Wasserproben auch noch weitere organische Komponenten vorliegen konnten, die eventuell für die NF- κ B Aktivierung verantwortlich sind, wurde zusätzlich ein Methanol-Extrakt der aus dem Zulauf-Wasser entfernten Feststoffe hergestellt, welcher jedoch ebenfalls keinen Effekt auf die Makrophagen zeigte.

4.3.2 Endotoxine im Wasser als NF- κ B Aktivatoren

Da durch die Zugabe der Wasserproben zwar ein starker Anstieg der NO-Produktion zu beobachten war, es allerdings nicht zu einer signifikanten additiven Wirkung bei gleichzeitiger Gabe von LPS kam, wurde vermutet, dass im Wasser enthaltene Endotoxine die Ursache für die aufgetretenen Effekte waren. LPS zählt als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien zu den Endotoxinen. Auch als Komponenten von abgestorbenen Mikroorganismen sind diese Substanzen in der Lage z. B. Makrophagen zu aktivieren und unspezifische Entzündungsreaktionen hervorzurufen [Reichl, 2002]. Da der Zulauf einer Kläranlage zum großen Teil aus Fäkalien und somit auch aus einer hohen Anzahl sowohl toter als auch lebendiger Mikroorganismen besteht, ist ein hoher Gehalt an Endotoxinen und/oder deren Bestandteile in der in dieser Arbeit untersuchten Zulauf-Wasserprobe wahrscheinlich. Aufgrund der Sterilfiltration aller Wasserproben und einer anschließenden Überprüfung auf Kontamination mittels eines Ausstrichs auf einer Nährplatte mit negativem Ergebnis, konnte die Anwesenheit von lebenden Mikroorganismen zuverlässig ausgeschlossen werden. Daraufhin wurden mit Hilfe eines speziellen Verfahrens (PolymyxinB-Säule) die Endotoxine aus dem Zulauf-Wasser entfernt. Die mit diesem Wasser behandelten RAW 264.7 Zellen zeigten keinen Anstieg der NO-Produktion und die Ergebnisse waren vergleichbar mit denen der unbehandelten Zellen (Abb. 3.24). Diese Ergebnisse korrelierten zudem mit den in den A-549 und 1A11 Zellen beobachteten Effekten. Die geringe NF- κ B Aktivierung durch die Wasserproben ließ sich anhand des Mechanismus der LPS-induzierten Aktivierung der Signalkaskade erklären. LPS bindet an den Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) auf der Zelloberfläche [Guha & Mackman, 2001; Covert, *et al.*, 2005], welcher in den mit den A-549 Zellen durchgeführten FACS-Analysen nicht nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus konnte nach einer Stimulation mit LPS weder eine IL-6 Produktion der A-549 Zellen noch eine Expression des Reporterproteins in den 1A11 Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies legt die Vermutung nahe, dass die in dieser Arbeit verwendeten Epithelzellen den TLR4 nur sehr gering bis nicht auf der Zelloberfläche exprimieren und daher nur eine schwache LPS-abhängige NF- κ B Aktivierung zeigten. Bei Zugabe des Endotoxin-freien Wassers war dieser Effekt auch in den Epithelzellen nicht mehr zu beobachten.

Für die Untersuchung von nativen Wasserproben müssen die Testsysteme daher sorgfältig ausgewählt werden. Die Probenvorbereitung könnte beispielsweise durch eine Fraktionierung optimiert werden. So könnten verschiedene Substanzklassen separat analysiert und detektierte Effekte entsprechend zugeordnet werden.

4.4 Genexpressionsanalysen

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen lassen sich Vorgänge in einer Zelle als Antwort auf bestimmte Behandlungen untersuchen. Die zuvor in den Testsystemen bestimmten Parameter zeigen nur einen kleinen Ausschnitt der komplexen Antwort auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Daher sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen einen Überblick über die Expression von verschiedenen Genen in den A-549 Zellen geben, die direkt oder indirekt mit der NF- κ B Signalkaskade assoziiert sind. Dazu wurde ein spezielles Kit der Firma SABiosciencesTM verwendet (2.2.11), mit dem eine parallele Untersuchung von 84 Genen möglich ist. Eine vollständige Liste der Gene sowie der Rohdaten (CP-Werte) findet sich im Anhang (6.1 & 6.2).

4.4.1 Analyse von 84 NF- κ B assoziierten Genen (*Human NF- κ B Signaling Pathway PCR Array*)

Unter den Genen des Arrays befanden sich u. a. die Gene für *IL-6* und *IL-8*, so dass hier zunächst anhand von Kontrollbehandlungen geprüft wurde, ob die in den Testsystemen zuvor gemessenen Parameter auf Ebene der Transkription bestätigt werden konnten. Dazu wurden zunächst für alle Gene und Behandlungen die Daten des *Fold Change* in Bezug auf die nur mit Kulturmedium behandelten Zellen ermittelt. Es zeigte sich hierbei eine deutliche Hochregulation der Expression von *IL-6* und *IL-8* bei Zugabe des Stimulanz IL-1 β (Abb. 3.32). Im direkten Vergleich dazu konnte bei der Behandlung mit dem NF- κ B Inhibitor BAY 11-7082 eine Inhibition der Expression der beiden Gene beobachtet werden. Auch für das zusätzlich als Kontrolle untersuchte Gen des interzellulären Adhäsionsmoleküls *ICAM-1* wurde diese Regulation detektiert. Als weiteres Beispiel zeigt Abb. 3.33 die *Fold Change* Werte für drei weitere Gene, deren Proteine direkt mit dem NF- κ B Signalweg verknüpft sind. Es handelt sich hierbei um die IKK-Proteine Beta und Epsilon sowie das Inhibitor-Protein *NFKBIA* (auch I κ B alpha), welches durch Bindung an NF- κ B im Zytoplasma den Transkriptionsfaktor im inaktiven Zustand hält. Für die *IKK ϵ* konnte bei Behandlung der Probe mit IL-1 β eine Hochregulation verzeichnet werden. Alle anderen Daten sowie die in Tab. 3.3 zusammengefassten Werte ausgewählter Gene zeigten keine signifikanten Regulationen bei den verschiedenen Behandlungen. Die Problematik der hier durchgeführten Genexpressionsanalysen lag dabei hauptsächlich an der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Es wurden nur zwei biologische Replikate analysiert, so dass kein verlässlicher Signifikanzwert ermittelt werden konnte. Zudem war es schwierig alle Behandlungen zu

vergleichen, da bei der Datenberechnung zunächst eine Normalisierung auf die Haushaltsgene erfolgte (CP-Werte, s. 6.2.1). Die Werte der Haushaltsgene waren während der Behandlungen nicht völlig konstant (CP-Werte für *HPRT1* von 21,05 bis 24,05; für *RPL13A* von 17,74 bis 20,64). Daraus ergeben sich durch die Differenzbildung automatisch Unterschiede bei den Ergebnissen der einzelnen Behandlungen. Des Weiteren wurden die zwei Replikate der untersuchten Proben gemittelt, so dass sich z. T. eine deutliche Veränderung dieser Werte zeigte. So wird beispielsweise aus den CP-Werten für das *IL-6* Gen bei der IL-1 β Behandlung (CP: 21,25; 23,27) ein *Fold Change* von 118, aus den CP-Werten der IL-1 β Behandlung mit Ibuprofen (CP: 23,48; 23,67) hingegen ergibt sich ein *Fold Change* Wert von 85. Hier scheint es zu einer Inhibition der *IL-6* Expression durch Ibuprofen zu kommen. Die Rohdaten zeigen jedoch, dass durch die Mittelwertbildung die Information des zweiten CP-Wertes der IL-1 β Behandlung verloren geht. Handelt es sich bei dem ersten Wert von 21,25 um einen Ausreißer, so ergibt sich *de facto* keine Inhibition durch die Zugabe von Ibuprofen. Die Problematik der *Fold Change* Werte liegt weiterhin darin begründet, dass ein Bezug zu einem Kontrollwert hergestellt wird. In dieser Arbeit handelte es sich dabei zumeist um unbehandelte Zellen, welche auch Schwankungen innerhalb der Werte aufwiesen (CP-Werte für das *IL-6* Gen: 28,25; 30,16). Diese Probleme betreffen grundlegend alle Ergebnisse der Genexpressionsanalysen. Daher müssen alle Aussagen, die bezüglich einer signifikanten Regulation eines Gens bei einer bestimmten Behandlung getroffen werden, immer durch die Betrachtung der entsprechenden Rohdaten validiert werden. Bei der Analyse von drei Replikaten könnten so z. B. auch Ausreißer besser identifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Genexpressionsanalysen durchgeführt, die einerseits zur Absicherung der vorangegangenen Ergebnisse dienen sollten, andererseits sollte eine Analyse der Konzentrationsabhängigkeiten von Diclofenac und Ibuprofen Aufschluss über mögliche Wirkungen im umweltrelevanten Bereich geben. Auch die nativen Wasserproben wurden dabei einer genaueren Betrachtung unterzogen.

4.4.2 Analyse von 10 NF- κ B assoziierten Genen (*Custom-made Array*)

Eine fokussierte Analyse von Diclofenac und Ibuprofen sowie der nativen Wasserproben erfolgte mittels 10 ausgewählter Gene aus dem NF- κ B Signalweg PCR Array. Der Auswahl der Gene lagen verschiedene Kriterien zugrunde. Die Gene für die Caspase 8 und die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (*CASP8* und *MAP3K*) wurden aufgrund ihrer Beteiligung an weiteren zellulären Signalprozessen ausgewählt. Bei *CASP8* handelt es sich um ein für die Apoptose essentielles Protein [Thorburn, 2004], die Kinase *MAP3K* ist Bestandteil einer

MAPK-Signalkaskade [Pearson *et al.*, 2001]. *SLC44A2*, ein Transportprotein, das Adaptor-molekül *TICAM1* und der TNF-Rezeptor *TNFRSF1A* zeigten Unterschiede in der Expression bei der vorherigen Behandlung mit zwei verschiedenen Diclofenac-Konzentrationen. Die Toll-like Rezeptoren 2 und 6 wurden als Oberflächenrezeptoren ausgewählt, um möglicherweise weitere Mikroorganismen-assoziierte Strukturen in den Wasserproben nachzuweisen [Medzhitov, 2001]. Als Kontrollen einer Hochregulation bei der Behandlung mit IL-1 β fungierten die Gene für *IL-6* und *IKBKE*. Die untersuchten Konzentrationsbereiche von Diclofenac und Ibuprofen lagen zwischen 50 $\mu\text{g/mL}$ und 25,6 pg/mL . Das Ablauf-Wasser der Kläranlage in Braunschweig wies eine Konzentration von 1165 pg/mL für Diclofenac und 164 pg/mL für Ibuprofen auf. Auch im Main-Wasser konnte Diclofenac nachgewiesen werden (315 pg/mL). Die niedrigsten Konzentrationen der Verdünnungsreihe lagen daher im umweltrelevanten Bereich. Die Wasserproben wurden in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen eingesetzt (1:2 und 1:4), wobei destilliertes Wasser als Kontrolle diente. Bei der Auswertung der Daten traten bei diesen Experimenten jedoch Probleme auf. Wie oben bereits erwähnt, sind die Kontrolldaten der unbehandelten Zellen wichtig, da ein Bezug hergestellt werden muss, um die Ergebnisse der behandelten Proben bewerten zu können. Daher wurden für diese Untersuchungen die Kontrollen als dreifache biologische Replikate durchgeführt, um zufällige Schwankungen auszuschließen. Die CP-Werte zeigten jedoch vor allem in der Kontrollbehandlung nicht auswertbare Daten (s. 6.2.2). Es konnte in einigen Proben kein Signal detektiert werden und für einige Gene (z. B. *CASP8*) waren die Werte zur Analyse ungeeignet. Es erfolgte daher ein Vergleich zu den nur mit IL-1 β behandelten Proben. Die Wasserproben konnten mit der jeweiligen Probe für das destillierte Wasser verglichen werden. Die Haushaltsgene zeigten für alle Behandlungen vergleichbare Resultate und auch eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus dem NF- κB Signalweg PCR Array. Somit kann ein technisches Problem während der PCR ausgeschlossen werden. Für die untersuchten Proben konnte keine Korrelation der Expression mit den Behandlungen beobachtet werden. Es kann hier keine Aussage zu einer Konzentrationsabhängigkeit getroffen werden. Auch die nativen Wasserproben verhielten sich bei der Expression der untersuchten Gene unauffällig (Abb. 3.34 und 3.35). Zudem konnte bei der Analyse aller CP-Werte ein großer Anteil an Werten über 35 festgestellt werden. Da bei der Datenaufbereitung alle Werte, die über 35 liegen oder für die kein Signal detektiert wurde, auf einen Wert von 35 gesetzt werden (CP *cut-off*), kommt es infolgedessen zu falschen Daten für den *Fold Change*. Eine zuverlässige Bewertung der mit dem *Custom-made* PCR Array erzielten Ergebnisse ist unter diesen Umständen nicht möglich. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die

ausgewählten Gene sowie die A-549 Epithelzellen für die durchgeführten Analysen ungeeignet waren.

Darüber hinaus könnte eine mangelnde Reproduzierbarkeit der Grund für Unterschiede in den Daten der beiden Arrays sein. Beim *Human NF- κ B Signaling Pathway PCR Array* wurden nicht so viele CP-Werte > 35 beobachtet. Hohe CP-Werte deuten auf eine geringe Expression der Gene hin, die aber auch durch eine geringe RNA-Konzentration und nicht durch eine spezifische Regulation verursacht werden kann. Die experimentellen Bedingungen wurden für den *Custom-made Array* leicht verändert (Kultivierung der Zellen in 6-Well-Platten anstatt 25 cm² Flaschen), was eine Verringerung der Zellzahl und der RNA-Konzentration zur Folge hatte. Für eine hohe Reproduzierbarkeit der Array-Daten scheint daher eine konstant hohe absolute RNA-Konzentration notwendig zu sein.

Zusammenfassend ist zu erwähnen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen im Vergleich zu den vorangegangenen Experimenten zur physiologischen Funktion der Zellen und zum spezifischen Nachweis der NF- κ B Aktivierung keine neuen Informationen lieferten. Auf der Transkriptionsebene konnten die zuvor anhand der sekretierten Proteine ermittelten Ergebnisse bestätigt werden, jedoch wurden für die Pharmazeutika Diclofenac und Ibuprofen sowie für die Wasserproben keine weiteren auffälligen Effekte auf die Expression der NF- κ B assoziierten Gene beobachtet.

4.5 Umweltrelevanz und Bewertung der Testsysteme

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Testsysteme entwickelt werden, die schädigende Wirkungen von Substanzen in der aquatischen Umwelt anzeigen können, die nicht durch eine unspezifische Toxizität bedingt sind. Die in der Einleitung beschriebenen Analyse-Methoden (vgl. 1.3) stützen sich zumeist auf bestimmte Organismengruppen, anhand derer über verschiedene Parameter angegeben wird, ob eine Probe toxische Effekte ausübt, beispielsweise indem spezifisch eine Funktion (z. B. Schwimmfähigkeit von *Daphnia magna*) beeinträchtigt ist. Da unter den seit mehreren Jahren immer häufiger in Wasseranalysen auftretenden anthropogenen Stoffen die Pharmazeutika eine bedeutende Rolle spielen, lag der Fokus der hier vorgestellten Arbeit auf Wirkungen, die von diesen speziellen Substanzen ausgehen könnten. Die Testsysteme wurden daher darauf ausgelegt, dass mögliche schädigende Effekte durch z. B. entzündungshemmende Medikamente wie Acetylsalicylsäure oder Diclofenac angezeigt werden können. Es wurden Makrophagen und Epithelzellen als zelluläre Basis gewählt, da diese direkt in inflammatorische Prozesse involviert sind. Der Transkriptionsfaktor NF- κ B ist als essentieller Regulator an den entsprechenden intrazellulären Signaltransduktionskaskaden beteiligt. Zur Analyse möglicher Effekte auf diese Vorgänge wurden Proteine bestimmt, die eine NF- κ B abhängige Expression zeigen. Es handelte sich dabei zunächst um die physiologische Zellantwort auf die Aktivierung von NF- κ B gehörende Parameter wie NO (RAW 264.7) und IL-6 bzw. IL-8 (A-549). Zusätzlich wurde ein Reportersystem mit den A-549 Epithelzellen als Grundlage entwickelt, welches die direkte Analyse von NF- κ B anhand eines Reporterproteins möglich machte. Mittels dieser Testsysteme wurden ausgewählte Pharmazeutika sowie native Wasserproben untersucht.

4.5.1 Umweltrelevanz

In allen verwendeten Testsystemen konnten für die eingesetzten pharmazeutischen Substanzen keine Effekte in den umweltrelevanten Konzentrationen detektiert werden. Alle beobachteten Wirkungen auf die gemessenen Parameter lagen im Konzentrationsbereich von mg/L während die im Wasser gefundenen Substanzen hauptsächlich im ng/L- bis μ g/L-Bereich vorliegen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier gezeigten Effekte der Pharmazeutika für den Umweltbereich nicht relevant sind. Schädigende Wirkungen der Substanzen sind dennoch nicht komplett auszuschließen. Neben der akuten Toxizität in hohen Konzentrationsbereichen der Pharmazeutika, konnten in diesem System z. B. für Diclofenac anhand einer Veränderung in der Morphologie Effekte detektiert werden, die nicht mit den

Daten aus dem eigentlichen Toxizitätstest korrelierten (Abb. 3.14). Die Zellen waren z. T. abgerundet und nicht mehr am Untergrund angeheftet, was auf eine beginnende Apoptose hindeuten kann [Häcker, 2000]. Alle Experimente im Rahmen dieser Arbeit hatten eine Inkubationszeit von maximal 24 h, mögliche Langzeiteffekte oder chronische Wirkungen konnten nicht detektiert werden. In der Umwelt sind die Organismen jedoch meist über einen längeren Zeitraum den Substanzen ausgesetzt, so dass hier Tests notwendig sind, welche auch chronische Effekte erfassen [Schmitt *et al.*, 2010]. Erste Untersuchungen wurden während dieser Arbeit durchgeführt. Die A-549 Epithelzellen wurden für 30 d in Medium kultiviert, welches Diclofenac (10 µg/mL), Ibuprofen und Carbamazepin (je 100 µg/mL) enthielt. Anschließend wurden die Zellen stimuliert und hinsichtlich der Produktion von IL-6 und IL-8 untersucht. Es konnten sowohl bei den A-549 Zellen als auch bei den parallel analysierten 1A11 Reporterzellen keine Auswirkungen beobachtet werden. Ein weiterer Umweltaspekt ist zudem die unkontrollierte Exposition von Organismen in der Umwelt, die nicht zur Zielgruppe der Medikamente gehören. Dies kann zu unerwünschten Wirkungen führen, die beispielsweise auch durch die bekannten Nebenwirkungen eines Medikaments hervorgerufen werden können. Ein Beispiel hierfür war der Rückgang einer Geierpopulation in Pakistan durch die Aufnahme von mit Diclofenac verseuchtem Fleisch [Oaks *et al.*, 2004]. Hier zeigte sich bei untersuchten Tieren, dass ein akutes Nierenversagen zum Tod führte. Nierenfunktionsstörungen gehören unter anderem zu den bekannten Nebenwirkungen nicht-steroidaler antiinflammatorischer Wirkstoffe [Mutschler *et al.*, 2008]. Darüber hinaus liegen in der Umwelt komplexe Mischungen von pharmazeutischen Substanzen und deren Abbauprodukten vor, so dass bei einer Einzeltestung oder auch bei der Analyse einer definierten Mischung keine genauen Aussagen über synergistische Effekte möglich sind. Es konnte jedoch in *Daphnien*- und Algen-Tests mit Mischungen von NSAID festgestellt werden, dass die toxische Konzentration sich im Vergleich zu den Einzelsubstanzen verringert [Cleuvers, 2004].

Die hier vorgestellten zellulären Testsysteme bieten im Gegensatz zu den Tests auf Mobilitätseffekte oder Toxizität spezieller Organismen den Vorteil, dass ein großes Spektrum von verschiedenen Organismen abgedeckt werden kann. Organspezifische Zelllinien aus unterschiedlichen Lebewesen können dazu dienen, vermeintliche Störungen einer bestimmten Zellfunktion, hier z. B. der NF-κB Signalweg, anzuzeigen. Des Weiteren kann unabhängig einer akuten Toxizität getestet werden, ob es zu reparablen oder irreversiblen Zellschädigungen kommt, ohne dafür Tierversuche einzusetzen. Die Testsysteme könnten weiterhin zunächst auf die zu untersuchenden Substanzen und deren Wirkweisen abgestimmt

werden. Das bedeutet, es müssten Informationen über die Pharmazeutika hinsichtlich ihrer biologischen Strukturen und Wirkweisen und der vermuteten Konzentration in der Umwelt vorliegen, um daraufhin die geeigneten Zellen und zu messenden Parameter zu bestimmen [Tarazona *et al.*, 2010].

4.5.2 NF- κ B als Testsystem

Intrazelluläre Signalkaskaden sind für Reaktionen eines Organismus auf externe Stimuli essentiell. NF- κ B spielt als Transkriptionsfaktor bei der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen eine Rolle [Hoffmann & Baltimore, 2006]. Vor allem die Funktion während Entzündungsreaktionen führte zur Auswahl von NF- κ B als Basis der hier vorgestellten Testsysteme. Die Interaktion mit anderen Signalwegen macht die zentrale Rolle von NF- κ B zusätzlich deutlich [Li & Stark, 2002; Bouwmeester *et al.*, 2004]. Ein Beispiel für die Vernetzung mit weiteren Signalwegen zeigt Abbildung 4.2. Die Kinase IKK α ist in der Lage, Proteine zu phosphorylieren, die keine direkten Komponenten des NF- κ B Signalwegs sind [Perkins, 2007].

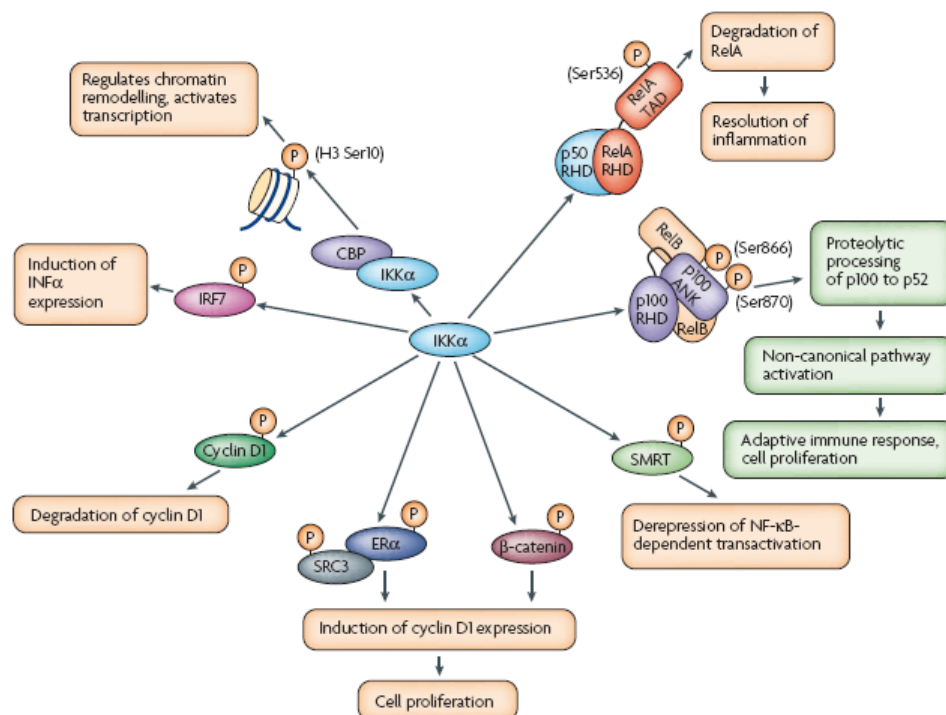


Abb. 4.2: Konsequenzen einer Aktivierung von IKK α
[Perkins, 2007]

Die Funktion von NF- κ B während der Apoptose ist ein weiterer wichtiger Aspekt dieses Transkriptionsfaktors. Hierbei wirkt NF- κ B zumeist als Inhibitor des programmierten

Zelltods, wobei eine konstitutive NF- κ B Aktivität z. B. in Tumorzellen eine Apoptose-Resistenz zur Folge hat [Dutta *et al.*, 2006]. Die Verknüpfung mit Apoptose-Signalwegen zeigt außerdem, dass auch bei toxischen Effekten von Substanzen, wie oben für Diclofenac beschrieben, eine Rolle von NF- κ B nicht ausgeschlossen ist. Ein direkter Eingriff nicht-steroidaler antiinflammatorischer Wirkstoffe in die entsprechenden Signalwege ist zudem nachgewiesen [Jana, 2008]. Die NSAID sind dabei in der Lage, durch eine Inhibition von NF- κ B die Apoptose zu induzieren. Daher ist für eine Analyse von unerwünschten Wirkungen der entsprechenden Pharmazeutika der NF- κ B Signalweg von großer Bedeutung. Die Regulation der NF- κ B Signalkaskade ist zudem überaus komplex. Es kommt u. a. zu einem sogenannten negativen *Feedback* zwischen den einzelnen Komponenten der Kaskade, so dass eine unkontrollierte Aktivität vermieden wird [Hoffmann *et al.*, 2002]. Außerdem kann die Aktivierung sowie die Inhibierung von NF- κ B Zelltyp-abhängig stark variieren. Je nach Zellfunktion sind Oberflächenrezeptoren unterschiedlich ausgeprägt, so dass spezifische Muster erkannt werden und die darauf abgestimmte NF- κ B Antwort aktiviert wird. Dies wird z. B. durch die unterschiedliche Reaktion der Makrophagen und Epithelzellen auf die Stimulation mit LPS deutlich.

Alle diese Vernetzungen tragen zu einer sehr komplexen Funktion von NF- κ B bei, so dass hier von einer Vielzahl von möglichen Beeinflussungen ausgegangen werden muss. Bei Substanzen, deren Funktion nicht genau definiert ist, sind daher neben den primären Wirkungen auf die NF- κ B Reaktionskaskade auch sekundär auftretende Effekte möglich. Ursache dafür könnte dann z. B. eine Langzeitexposition mit den Substanzen sein.

Zusammenfassend ist die NF- κ B Signalkaskade eine geeignete Basis für den Nachweis eines universellen Eingriffs von Substanzen in essentielle zelluläre Signalweiterleitungsprozesse. Nachteile ergeben sich aus der geringen Spezifität der nachgewiesenen Effekte. Aufgrund der zentralen Rolle von NF- κ B in fast allen Zelltypen, ist es somit schwierig, von einem Effekt auf den genauen Angriffspunkt der Substanz zu schließen. Je nach Wirkweise der zu testenden Stoffe sollte das Testsystem daher angepasst werden und zusätzlich weitere Parameter mit in die Analysen einbezogen werden. Dazu könnte z. B. der Nachweis der Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren wie dem Aktivator-Protein-1 (AP-1) gehören. AP-1 wird durch die MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert und ist z. B. in Makrophagen in der Lage, mit dem NF- κ B Signalweg zu interferieren [Hu *et al.*, 2007]. Es könnten außerdem anhand von Genexpressionsanalysen von Behandlungen mit verschiedenen Pharmazeutika weitere Faktoren identifiziert werden, die in anschließenden Untersuchungen weiter charakterisiert und dann als Grundlage für das Testsystem verwendet werden können.

4.5.3 Fazit & Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Testsysteme wurden erfolgreich für den Nachweis einer Beeinflussung der Aktivierung des NF- κ B Signalwegs eingesetzt. Die verwendeten Makrophagen und Epithelzellen zeigten zuverlässig Veränderungen dieser Signalkaskade mittels der gemessenen Parameter (NO bzw. Interleukine) an. Auch ein speziell auf diesen Signalweg ausgelegtes Reportersystem zeigte positive Ergebnisse bezüglich der Funktionalität und bestätigte alle mit den physiologischen Antworten beobachteten Effekte. Die NF- κ B Spezifität aller Systeme war damit gegeben. Hinsichtlich der Anwendung unter umweltanalytischen Aspekten muss jedoch gesagt werden, dass zurzeit keine Notwendigkeit gegeben ist, die Systeme in Standardtests mit einzubeziehen. Es konnten für die untersuchten Pharmazeutika und auch für die nativen Wasserproben keine umweltrelevanten Effekte detektiert werden. Die weitere Verfolgung und Optimierung dieser Ansätze ist jedoch durchaus lohnenswert. Gerade zu den chronischen Effekten der in der Umwelt gefundenen Substanzen gibt es wenig Daten, mit etablierten Zelllinien könnten hier Testreihen entwickelt werden, die einen bestimmten Faktor wie NF- κ B über einen längeren Zeitraum beobachten. Hier könnten auch Zellen aus verschiedenen Organen und Organismen zum Einsatz kommen. Unterschiedlich ausgeprägte Signalwege und auch die Diversität von Oberflächenrezeptoren sind bei der Auswahl der Zelllinien unbedingt zu beachten. Es ist daher schwierig eine einheitliche Richtlinie oder Standardisierung dieser Tests zu erreichen, da zunächst alle veränderlichen Größen (Zelltyp, Messgrößen, Substanzklasse) aufeinander abgestimmt werden müssen. Ganzgenomanalysen könnten hier einen Ansatz bieten, mit dem z. B. Profile für die verschiedenen Substanzklassen der Pharmazeutika erstellt werden könnten. Werden dann individuelle Muster für die Substanzen gefunden, so können auf dieser Grundlage weitere Untersuchungen mit entsprechenden Zelllinien (z. B. neuronale Zellen) und Messgrößen durchgeführt werden. Darüber hinaus können auch Marker gefunden werden, die eine chronische Schädigung anzeigen könnten. Mit Hilfe von akuten Veränderungen in der Genexpression können dann Aussagen über mögliche Langzeiteffekte getroffen werden. Die neu entwickelten Testsysteme stellen momentan noch keine Alternative zu den etablierten Testverfahren dar, bilden jedoch eine Grundlage für weitere Entwicklungen.

5 LITERATUR

- Alberts, B. et al. *Molecular Biology Of The Cell* (Garland Science Taylor & Francis Group, 2002).
- Ames, B. N., McCann, J. & Yamasaki, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31, 347-64 (1975).
- Arnold, R., Humbert, B., Werchau, H., Gallati, H. & Konig, W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology* 82, 126-33 (1994).
- Bals, R. & Hiemstra, P. S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J* 23, 327-33 (2004).
- Bouwmeester, T. et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105 (2004).
- Bubici, C., Papa, S., Dean, K. & Franzoso, G. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25, 6731-48 (2006).
- Caliman, F. A. & Gavrilescu, M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean - Soil, Air, Water* 37, 277 (2009).
- Chen, P. et al. Involvement of PKC, p38 MAPK and AP-2 in IL-1beta-induced expression of cyclooxygenase-2 in human pulmonary epithelial cells. *Respirology* 11, 18-23 (2006).
- Cleuvers, M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol Environ Saf* 59, 309-15 (2004).
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E. & Baltimore, D. Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science* 309, 1854-7 (2005).
- Daughton, C. G. & Ternes, T. A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6, 907-38 (1999).
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB. *Oncogene* 25, 6868-86 (2006).
- DIN 38412-L9: Algenwachstumshemmtest

- DIN 38412-L11: Bestimmung der Wirkung von Wasserinhaltsstoffen auf Kleinkrebse (Daphnien-Kurzzeittest, *Daphnia magna*)
- Dutta, J., Fan, Y., Gupta, N., Fan, G. & Gelinas, C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* 25, 6800-16 (2006).
- Fang, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* 2, 820-32 (2004).
- Fent, K. Ökotoxikologie (Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, 2003).
- Fent, K. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. *Altex* 24 Spec No, 26 (2007).
- Fent, K., Weston, A. A. & Caminada, D. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76, 122-59 (2006).
- Fox, N. J. & Ward, K. J. Pharma in the bedroom. and the kitchen. The pharmaceuticalisation of daily life. *Sociol Health Illn* 30, 856-68 (2008).
- Fukata, M. & Abreu, M. T. Role of Toll-like receptors in gastrointestinal malignancies. *Oncogene* 27, 234-43 (2008).
- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16, 225-60 (1998).
- Giard, D. J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-23 (1973).
- Gilmore, T. D. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* 25, 6680-4 (2006).
- Gilmore, T. D. & Herscovitch, M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* 25, 6887-99 (2006).
- Grummt, T., Rettberg, P., Waldmann, P., Zipperle, J. & Hansen, P. D. in Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution (eds. Barcelo, D., Barcelo, D. & Hansen, P. D.) 187 (2009).
- Guha, M. & Mackman, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13, 85-94 (2001).
- Gururaja, T. L. et al. A class of small molecules that inhibit TNFalpha-induced survival and death pathways via prevention of interactions between TNFalphaRI, TRADD, and RIP1. *Chem Biol* 14, 1105-18 (2007).
- Häcker, G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5-17 (2000).
- Hoffmann, A. & Baltimore, D. Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev* 210, 171-86 (2006).

- Hoffmann, A., Levchenko, A., Scott, M. L. & Baltimore, D. The IkappaB-NF-kappaB signaling module: temporal control and selective gene activation. *Science* 298, 1241-5 (2002).
- Holden, N. S., Catley, M. C., Cambridge, L. M., Barnes, P. J. & Newton, R. ICAM-1 expression is highly NF-kappaB-dependent in A549 cells. No role for ERK and p38 MAPK. *Eur J Biochem* 271, 785-91 (2004).
- Hu, X., Chen, J., Wang, L. & Ivashkiv, L. B. Crosstalk among Jak-STAT, Toll-like receptor, and ITAM-dependent pathways in macrophage activation. *J Leukoc Biol* 82, 237-43 (2007).
- Ichiyama, T. et al. Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. *Brain Res* 857, 246-51 (2000).
- ISO 1134812-3 (2007): Wasserbeschaffenheit - Bestimmung der Hemmwirkung von Wasserproben auf die Lichtemission von *Vibrio fischeri* (Leuchtbakterientest) - Teil 3: Verfahren mit gefriergetrockneten Bakterien; Deutsche Fassung EN ISO 11348-3:2008
- Jana, N. R. NSAIDs and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* 65, 1295 (2008).
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. Immunologie (Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg Berlin, 2002).
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. & Sumpter, J. P. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32, 2498 (1998).
- Jones, E., Adcock, I. M., Ahmed, B. Y. & Punchard, N. A. Modulation of LPS stimulated NF-kappaB mediated Nitric Oxide production by PKCepsilon and JAK2 in RAW macrophages. *J Inflamm (Lond)* 4, 23 (2007).
- Joss, A. et al. Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water Res* 40, 1686-96 (2006).
- Jung, Y. D. et al. Role of P38 MAPK, AP-1, and NF-kappaB in interleukin-1beta-induced IL-8 expression in human vascular smooth muscle cells. *Cytokine* 18, 206-13 (2002).
- Kim, J. B. et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 30, 2345-51 (2007).
- Kim, J. Y. et al. Methoxychlor-induced inducible nitric oxide synthase and proinflammatory cytokines expression in macrophages via NF-kappaB, ERK, and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 1234-40 (2005).

- Klippel, N. in Fakultät für Lebenswissenschaften; „Interaktionen des humanpathogenen Hefepilzes *Candida albicans* mit Phagozyten“ (Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2009).
- Knight, A. Non-animal methodologies within biomedical research and toxicity testing. *Altex* 25, 213 (2008).
- Kumar, A., Takada, Y., Boriek, A. M. & Aggarwal, B. B. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med* 82, 434-48 (2004).
- Kümmerer, K. E. Pharmaceuticals in the Environment (Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001).
- Kwon, S. & George, S. C. Synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 3, 348-57 (1999).
- Kwon, S., Newcomb, R. L. & George, S. C. Mechanisms of synergistic cytokine-induced nitric oxide production in human alveolar epithelial cells. *Nitric Oxide* 5, 534-46 (2001).
- Länge, R. et al. Effects of the synthetic estrogen 17 alpha-ethinylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20, 1216-27 (2001).
- Lee, C. H., Olson, P. & Evans, R. M. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology* 144, 2201-7 (2003).
- Legler, J. et al. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 48, 55-66 (1999).
- Li, X. & Stark, G. R. NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30, 285-96 (2002).
- Lilienblum, W. et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch Toxicol* 82, 211-36 (2008).
- Lin, C. C. et al. IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal* 21, 1652-62 (2009).
- Lin, M. W. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-stimulated NO production by a novel synthetic compound CYL-4d in RAW 264.7 macrophages involving the blockade of MEK4/JNK/AP-1 pathway. *Biochem Pharmacol* 73, 1796-806 (2007).

- Liu, S. F., Ye, X. & Malik, A. B. Inhibition of NF-kappaB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents In vivo expression of proinflammatory genes. *Circulation* 100, 1330-7 (1999).
- Lubin, F. D., Ren, Y., Xu, X. & Anderson, A. E. Nuclear factor-kappa B regulates seizure threshold and gene transcription following convulsant stimulation. *J Neurochem* 103, 1381-95 (2007).
- Lüderitz, B. in Fakultät für Lebenswissenschaften; „Einfluss von Naturstoffen auf die Funktionen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7“ (Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, 2008).
- Luster, M. I. & Rosenthal, G. J. Chemical agents and the immune response. *Environ Health Perspect* 100, 219-26 (1993).
- Medzhitov, R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135-45 (2001).
- Miller, L., Alley, E. W., Murphy, W. J., Russell, S. W. & Hunt, J. S. Progesterone inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 59, 442-50 (1996).
- Mitchell, J. A. & Warner, T. D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* 128, 1121-32 (1999).
- Murk, A. J. et al. Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): a novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water. *Fundam Appl Toxicol* 33, 149-60 (1996).
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Ruth, P. & Schäfer-Korting, M. Mutschler Arzneimittelwirkungen - Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 2008).
- Neels, H. M. et al. Therapeutic drug monitoring of old and newer anti-epileptic drugs. *Clin Chem Lab Med* 42, 1228-55 (2004).
- Newton, R. et al. Repression of inflammatory gene expression in human pulmonary epithelial cells by small-molecule IkappaB kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 321, 734-42 (2007).
- Nikolaou, A., Meric, S. & Fatta, D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 387, 1225-34 (2007).
- Oaks, J. L. et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427, 630-3 (2004).
- OECD Guideline 203: Fish, Acute Toxicity Test; www.oecd.org/env/testguidelines
- OECD Guideline 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test; www.oecd.org/env/testguidelines

- O'Neill, L. A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2000, RE1 (2000).
- Pahl, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-66 (1999).
- Pearson, G. et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22, 153-83 (2001).
- Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 49-62 (2007).
- Persoone, G. et al. Review on the acute *Daphnia magna* toxicity test - Evaluation of the sensitivity and the precision of assays performed with organisms from laboratory cultures or hatched from dormant eggs. *Knowl Managt Aquatic Ecosyst* 393, 01-29 (2009).
- Pierce, J. W. et al. Novel inhibitors of cytokine-induced IkappaBalpha phosphorylation and endothelial cell adhesion molecule expression show anti-inflammatory effects in vivo. *J Biol Chem* 272, 21096-103 (1997).
- Raschke, W. C., Baird, S., Ralph, P. & Nakoinz, I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* 15, 261-7 (1978).
- Reichl, F.-X. Taschenatlas der Toxikologie (Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, Stuttgart, 2002).
- Richardson, S. D. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 79, 4295-323 (2007).
- Rosal, R. et al. Ecotoxicity assessment of lipid regulators in water and biologically treated wastewater using three aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res Int* 17, 135-44 (2010).
- Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15, 241 (1996).
- Schindler, U. & Baichwal, V. R. Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol* 14, 5820-31 (1994).
- Schmitt, H. et al. Recommendations on the environmental risk assessment of pharmaceuticals: Effect characterization. *Integr Environ Assess Manag* 6, 588-602 (2010).

- Schreck, R., Meier, B., Mannel, D. N., Droge, W. & Baeuerle, P. A. Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 175, 1181-94 (1992).
- Schröder, A. in Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie; „Arylazoamidoxime und verwandte Substanzen als NO-Donoren“ (Freie Universität Berlin, Berlin, 2007).
- Schroder, K., Sweet, M. J. & Hume, D. A. Signal integration between IFNgamma and TLR signalling pathways in macrophages. *Immunobiology* 211, 511-24 (2006).
- Sen, R. & Baltimore, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-16 (1986).
- Smith, P. K. et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85 (1985).
- Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A. & van der Burg, B. Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Sci* 83, 136-48 (2005).
- Sonneveld, E. et al. Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol Sci* 89, 173-87 (2006).
- Steinhilber, D. & Schubert-Zsilavecz, M. Molekularpharmakologie und medizinische Chemie der Fibrate. Wirkstoffe zur Senkung des Triglyceridspiegels. *Pharmazie in unserer Zeit* 36, 108-12 (2007).
- Stuehr, D. J. et al. N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J Biol Chem* 266, 6259-63 (1991).
- Swantek, J. L., Christerson, L. & Cobb, M. H. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha promoter activity is inhibitor of nuclear factor-kappaB kinase-dependent. *J Biol Chem* 274, 11667-71 (1999).
- Takada, Y., Bhardwaj, A., Potdar, P. & Aggarwal, B. B. Nonsteroidal anti-inflammatory agents differ in their ability to suppress NF-kappaB activation, inhibition of expression of cyclooxygenase-2 and cyclin D1, and abrogation of tumor cell proliferation. *Oncogene* 23, 9247-58 (2004).
- Tarazona, J. V., Escher, B. I., Giltrow, E., Sumpter, J. & Knacker, T. Targeting the environmental risk assessment of pharmaceuticals: Facts and fantasies. *Integr Environ Assess Manag* 6, 603-13 (2010).
- Ternes, T. A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends Anal Chem* 20, 419-434 (2001).
- Thorburn, A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* 16, 139-44 (2004).

- Tosi, M. F. et al. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-dependent and ICAM-1-independent adhesive interactions between polymorphonuclear leukocytes and human airway epithelial cells infected with parainfluenza virus type 2. *J Immunol* 149, 3345-9 (1992).
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4 (1979).
- Tsikas, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 851, 51-70 (2007).
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P. V. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 57, 2823-9 (2007).
- Van der Linden, S. C. et al. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol* 42, 5814-20 (2008).
- Vane, J. R. & Botting, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res* 44, 1-10 (1995).
- Voccia, I., Blakley, B., Brousseau, P. & Fournier, M. Immunotoxicity of pesticides: A review. *Toxicol Ind Health* 15, 119-32 (1999).
- Warner, T. D. & Mitchell, J. A. Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* 18, 790-804 (2004).
- Webb, S., Ternes, T., Gibert, M. & Olejniczak, K. Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. *Toxicol Lett* 142, 157-67 (2003).
- Winzen, R. et al. The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J* 18, 4969-80 (1999).
- Xie, Q. W., Kashiwabara, Y. & Nathan, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269, 4705-8 (1994).
- 155 BDS CALUX Panel 2010 Water testing: CALUX panel for water analysis – Effect based bioanalysis for the 21st century; <http://www.biodetectionsystems.com>

6 ANHANG

6.1 Genlisten der SABiosciences™ PCR Arrays

6.1.1 Human NF-κB Signaling Pathway RT²Profiler™ PCR Array

| Unigene | Refseq | Symbol | Beschreibung |
|-----------|-----------|---------|---|
| Hs.19383 | NM_000029 | AGT | Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8) |
| Hs.525622 | NM_005163 | AKT1 | V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 |
| Hs.648565 | NM_005171 | ATF1 | Activating transcription factor 1 |
| Hs.193516 | NM_003921 | BCL10 | B-cell CLL/lymphoma 10 |
| Hs.31210 | NM_005178 | BCL3 | B-cell CLL/lymphoma 3 |
| Hs.69771 | NM_001710 | CFB | Complement factor B |
| Hs.696238 | NM_001166 | BIRC2 | Baculoviral IAP repeat-containing 2 |
| Hs.405153 | NM_006092 | NOD1 | Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 |
| Hs.2490 | NM_033292 | CASP1 | Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) |
| Hs.599762 | NM_001228 | CASP8 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase |
| Hs.303649 | NM_002982 | CCL2 | Chemokine (C-C motif) ligand 2 |
| Hs.472860 | NM_001250 | CD40 | CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5 |
| Hs.390736 | NM_003879 | CFLAR | CASP8 and FADD-like apoptosis regulator |
| Hs.198998 | NM_001278 | CHUK | Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase |
| Hs.1349 | NM_000758 | CSF2 | Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage) |
| Hs.2233 | NM_000759 | CSF3 | Colony stimulating factor 3 (granulocyte) |
| Hs.631631 | NM_020428 | SLC44A2 | Solute carrier family 44, member 2 |
| Hs.352224 | NM_080738 | EDARADD | EDAR-associated death domain |
| Hs.126667 | NM_057159 | LPAR1 | Lysophosphatidic acid receptor 1 |
| Hs.326035 | NM_001964 | EGR1 | Early growth response 1 |
| Hs.181128 | NM_005229 | ELK1 | ELK1, member of ETS oncogene family |
| Hs.482562 | NM_001992 | F2R | Coagulation factor II (thrombin) receptor |
| Hs.86131 | NM_003824 | FADD | Fas (TNFRSF6)-associated via death domain |
| Hs.2007 | NM_000639 | FASLG | Fas ligand (TNF superfamily, member 6) |
| Hs.25647 | NM_005252 | FOS | V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog |
| Hs.74471 | NM_000165 | GJA1 | Gap junction protein, alpha 1, 43kDa |
| Hs.517581 | NM_002133 | HMOX1 | Heme oxygenase (decycling) 1 |
| Hs.421649 | NM_000867 | HTR2B | 5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2B |
| Hs.643447 | NM_000201 | ICAM1 | Intercellular adhesion molecule 1 |
| Hs.37026 | NM_024013 | IFNA1 | Interferon, alpha 1 |
| Hs.93177 | NM_002176 | IFNB1 | Interferon, beta 1, fibroblast |
| Hs.856 | NM_000619 | IFNG | Interferon, gamma |
| Hs.597664 | NM_001556 | IKBKB | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta |
| Hs.321045 | NM_014002 | IKBKE | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon |
| Hs.43505 | NM_003639 | IKBKG | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma |
| Hs.193717 | NM_000572 | IL10 | Interleukin 10 |
| Hs.1722 | NM_000575 | IL1A | Interleukin 1, alpha |
| Hs.126256 | NM_000576 | IL1B | Interleukin 1, beta |
| Hs.701982 | NM_000877 | IL1R1 | Interleukin 1 receptor, type I |
| Hs.654458 | NM_000600 | IL6 | Interleukin 6 (interferon, beta 2) |

| Unigene | Refseq | Symbol | Beschreibung |
|-----------|-----------|-----------|---|
| Hs.624 | NM_000584 | IL8 | Interleukin 8 |
| Hs.522819 | NM_001569 | IRAK1 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 |
| Hs.449207 | NM_001570 | IRAK2 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 |
| Hs.714791 | NM_002228 | JUN | Jun oncogene |
| Hs.36 | NM_000595 | LTA | Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1) |
| Hs.1116 | NM_002342 | LTBR | Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3) |
| Hs.601217 | NM_173844 | MALT1 | Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 |
| Hs.657756 | NM_005921 | MAP3K1 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 |
| Hs.82116 | NM_002468 | MYD88 | Myeloid differentiation primary response gene (88) |
| Hs.631573 | NM_033297 | NLRP12 | NLR family, pyrin domain containing 12 |
| Hs.654408 | NM_003998 | NFKB1 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 |
| Hs.73090 | NM_002502 | NFKB2 | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2 (p49/p100) |
| Hs.81328 | NM_020529 | NFKBIA | Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha |
| Hs.130036 | NM_177952 | PPM1A | Protein phosphatase 1A (formerly 2C), magnesium-dependent, alpha isoform |
| Hs.159130 | NM_002880 | RAF1 | V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1 |
| Hs.631886 | NM_002908 | REL | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog (avian) |
| Hs.502875 | NM_021975 | RELA | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian) |
| Hs.654402 | NM_006509 | RELB | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B |
| Hs.436922 | NM_005798 | TRIM13 | Tripartite motif-containing 13 |
| Hs.247077 | NM_001664 | RHOA | Ras homolog gene family, member A |
| Hs.519842 | NM_003804 | RIPK1 | Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1 |
| Hs.187946 | NM_005415 | SLC20A1 | Solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1 |
| Hs.642990 | NM_007315 | STAT1 | Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa |
| Hs.505874 | NM_013254 | TBK1 | TANK-binding kinase 1 |
| Hs.710895 | NM_021649 | TICAM2 | Toll-like receptor adaptor molecule 2 |
| Hs.654532 | NM_003263 | TLR1 | Toll-like receptor 1 |
| Hs.519033 | NM_003264 | TLR2 | Toll-like receptor 2 |
| Hs.657724 | NM_003265 | TLR3 | Toll-like receptor 3 |
| Hs.174312 | NM_138554 | TLR4 | Toll-like receptor 4 |
| Hs.662185 | NM_006068 | TLR6 | Toll-like receptor 6 |
| Hs.659215 | NM_016562 | TLR7 | Toll-like receptor 7 |
| Hs.660543 | NM_138636 | TLR8 | Toll-like receptor 8 |
| Hs.87968 | NM_017442 | TLR9 | Toll-like receptor 9 |
| Hs.598832 | NM_182547 | TMED4 | Transmembrane emp24 protein transport domain containing 4 |
| Hs.241570 | NM_000594 | TNF | Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) |
| Hs.211600 | NM_006290 | TNFAIP3 | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 |
| Hs.591834 | NM_003844 | TNFRSF10A | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a |
| Hs.521456 | NM_003842 | TNFRSF10B | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b |
| Hs.279594 | NM_001065 | TNFRSF1A | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A |
| Hs.355307 | NM_001242 | CD27 | CD27 molecule |
| Hs.478275 | NM_003810 | TNFSF10 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10 |
| Hs.129708 | NM_003807 | TNFSF14 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14 |
| Hs.460996 | NM_003789 | TRADD | TNFRSF1A-associated via death domain |
| Hs.29344 | NM_182919 | TICAM1 | Toll-like receptor adaptor molecule 1 |
| Hs.534255 | NM_004048 | B2M | Beta-2-microglobulin |

| Unigene | Refseq | Symbol | Beschreibung |
|-----------|-----------|--------|--|
| Hs.412707 | NM_000194 | HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| Hs.523185 | NM_012423 | RPL13A | Ribosomal protein L13a |
| Hs.592355 | NM_002046 | GAPDH | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase |
| Hs.520640 | NM_001101 | ACTB | Actin, beta |
| N/A | SA_00105 | HGDC | Human Genomic DNA Contamination |
| N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |
| N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |
| N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |

6.1.2 Custom-made RT²Profiler™ PCR Array

| Unigene | Refseq | Symbol | Beschreibung |
|-----------|-----------|----------|---|
| Hs.599762 | NM_001228 | CASP8 | Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase |
| Hs.631631 | NM_020428 | SLC44A2 | Solute carrier family 44, member 2 |
| Hs.321045 | NM_014002 | IKBKE | Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon |
| Hs.654458 | NM_000600 | IL6 | Interleukin 6 (interferon, beta 2) |
| Hs.601217 | NM_173844 | MALT1 | Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1 |
| Hs.657756 | NM_005921 | MAP3K1 | Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 |
| Hs.519033 | NM_003264 | TLR2 | Toll-like receptor 2 |
| Hs.662185 | NM_006068 | TLR6 | Toll-like receptor 6 |
| Hs.279594 | NM_001065 | TNFRSF1A | Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A |
| Hs.29344 | NM_182919 | TICAM1 | Toll-like receptor adaptor molecule 1 |
| Hs.412707 | NM_000194 | HPRT1 | Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 |
| Hs.523185 | NM_012423 | RPL13A | Ribosomal protein L13a |
| N/A | SA_00105 | HGDC | Human Genomic DNA Contamination |
| N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| N/A | SA_00104 | RTC | Reverse Transcription Control |
| N/A | SA_00103 | PPC | Positive PCR Control |

6.2 Rohdaten (CP-Werte) der SABiosciencesTM PCR Arrays

6.2.1 Human NF- κ B Signaling Pathway RT²ProfilerTM PCR Array

| | Kon- trolle | Kon- trolle | IL- 1beta | IL- 1beta | TNF- alpha | TNF- alpha | IL + BAY | IL + BAY | IL + Dic 50 | IL + Dic 50 |
|---------|----------------|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------------|----------------|
| AGT | 27,54 | 29,35 | 30,81 | 30,6 | 30,76 | 28,98 | 29,61 | 31,21 | 32,16 | 31,71 |
| AKT1 | 23,21 | 23,64 | 24,21 | 22,78 | 23,53 | 23,25 | | 23,13 | 23,82 | 28,08 |
| ATF1 | 23,55 | 25,28 | 23,76 | 25,25 | 23,39 | 23,59 | 29,01 | 25,47 | 24,18 | 25,18 |
| BCL10 | 23,56 | 25,01 | 23,5 | 24,27 | 23,48 | 25,83 | 23,67 | 24,86 | 23,5 | 24,47 |
| BCL3 | 23,95 | 25,46 | 24,36 | 24,16 | 24,04 | | 22,5 | 24,9 | 24,09 | 25,28 |
| CFB | 23,72 | 26,12 | 19,78 | 20,75 | 19,87 | 23,82 | 21,05 | 22,07 | 22,14 | 22,06 |
| BIRC2 | 23,46 | 25,14 | 23,18 | 23,77 | 23,04 | 25,14 | 23,57 | 24,07 | 23,61 | 25,59 |
| NOD1 | 26,47 | 27,65 | 27,51 | 27,82 | 26,93 | 27,34 | 26,43 | 28,61 | 27,31 | 29,08 |
| CASP1 | 27,48 | 29,04 | | 30,09 | 27,87 | 28,22 | 26,7 | 29,64 | 27,85 | 28,28 |
| CASP8 | 27,18 | 28,15 | 26,98 | 27,91 | 26,62 | 30,3 | 26,5 | 28,72 | 28,22 | 34,49 |
| CCL2 | 24,74 | 25,27 | 19,51 | 21,07 | 19,91 | 23,56 | 22,29 | 21,54 | 22,2 | 23,41 |
| CD40 | 27,88 | 27,93 | 27,01 | 27,35 | 26,83 | 28,57 | 27,57 | 28,21 | 26,27 | 29,63 |
| CFLAR | 24,87 | 25,18 | 22,84 | 23,79 | 23,62 | 25,92 | 23,57 | 26,03 | 28,79 | 26,57 |
| CHUK | 24,19 | 24,99 | 23,57 | 24,26 | 23,06 | 25,17 | 23,68 | 24,97 | 30,36 | 26,09 |
| CSF2 | | 39,2 | 29,3 | 28,03 | 28,04 | 34,71 | 35,07 | 28,11 | 27,8 | 30,07 |
| CSF3 | 38,5 | >40 | 23,65 | 23,37 | 23,44 | 38,14 | 33,51 | 25,38 | 26,4 | 29,65 |
| SLC44A2 | 26,58 | 26,94 | 28,05 | 26,78 | 28,19 | 27,05 | 27,3 | 26,49 | 23,28 | 25,5 |
| EDARADD | 25,29 | 26,13 | 25,91 | 26,25 | 25,85 | 25,75 | 25,4 | 25,93 | 27,83 | 28,54 |
| LPAR1 | 26,35 | 27,16 | 25,7 | 24,71 | 24,77 | 33,64 | 25,9 | 26,12 | 25,53 | 27,74 |
| EGR1 | 24,2 | 27,75 | 24,87 | 28,36 | 25,17 | 28,69 | 25,14 | 29,46 | 0 | 30,43 |
| ELK1 | 25,14 | 26,27 | 25,79 | 25,82 | 25,72 | 26,38 | 25,84 | 27,06 | 25,71 | 28,69 |
| F2R | 26,31 | 25,99 | 25,02 | 26,7 | 25,5 | 26,02 | 24,98 | 26,41 | 27 | 29,19 |
| FADD | 23,31 | 29,43 | 24,02 | 29,17 | 23,59 | 33,88 | 23,7 | 28,91 | >40.00 | >40.00 |
| FASLG | | >40 | | 37,51 | | 0 | 37,71 | 39,4 | 0 | 0 |
| FOS | 22,83 | 24,21 | 24,6 | 27,55 | 24,3 | 24,01 | 24,28 | 27,44 | 27,11 | 26,74 |
| GJA1 | 23,87 | 24,69 | 21,45 | 21,74 | 21,11 | 24,1 | 21,58 | 22,82 | 21,47 | 24,12 |
| HMOX1 | 22,12 | 21,82 | 23,02 | 22,92 | 22,18 | 21,81 | 21,65 | 22,7 | 23,34 | 23,89 |
| HTR2B | 29,69 | 31,12 | 31,66 | 32,25 | 31,53 | 31,68 | 30,32 | 32,71 | 31,17 | 32,59 |
| ICAM1 | 28,6 | 29,99 | 23,35 | 24,07 | 23,42 | 26,64 | 24,93 | 25,58 | 24,83 | 26,08 |
| IFNA1 | 28,74 | 29,97 | 28,07 | 28,83 | 27,54 | 29,48 | 28,43 | 28,95 | 29,78 | 31,71 |
| IFNB1 | 35,29 | 39,3 | 35,21 | 35,46 | 35,96 | 36,22 | 36,85 | 35,85 | 33,67 | 36,79 |
| IFNG | | 0 | | 0 | 35,82 | 0 | | 0 | 0 | 33,63 |
| IKBKB | 24,89 | 28,68 | 25,09 | 24,92 | 24,29 | 25,44 | 24,75 | 26,15 | 30,64 | 27,53 |
| IKBKE | 26,21 | 36,34 | 23,72 | 25,83 | 23,78 | 29,07 | 25,17 | 28,32 | 35,13 | 29,94 |
| IKBKG | 24,28 | 27,46 | 24,86 | 24,58 | 24,99 | 25,74 | 26,06 | 25,61 | 26,33 | 28,48 |
| IL10 | | 0 | >40 | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| IL1A | 31,98 | 32,4 | 25,1 | 26,31 | 25,06 | 31,36 | 29,16 | 27,28 | 25,29 | 27,73 |
| IL1B | 31,82 | 32,22 | 24,85 | 25,85 | 25,33 | 31,78 | 29,05 | 26,6 | 30,73 | 29,39 |

| | Kon- trolle | Kon- trolle | IL- 1beta | IL- 1beta | TNF- alpha | TNF- alpha | IL + BAY | IL + BAY | IL + Dic 50 | IL + Dic 50 |
|------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------------|----------------|
| <i>IL1R1</i> | 24,52 | 25,85 | 26,18 | 25,44 | 25,76 | 25,55 | 24,79 | 25,36 | 26,05 | 28,66 |
| <i>IL6</i> | 28,25 | 30,16 | 21,25 | 23,27 | 21,27 | 28,8 | 24,16 | 24,05 | 23,66 | 25,21 |
| <i>IL8</i> | 25,12 | 25,55 | 17,56 | 18,04 | 17,62 | 23,15 | 20,67 | 19,63 | 18,69 | 20,52 |
| <i>IRAK1</i> | 23,88 | 22,86 | 25,14 | 22,84 | 24,77 | 25,3 | 24,82 | 23,56 | 25,04 | 28,97 |
| <i>IRAK2</i> | 26,2 | 25,71 | 22,64 | 22,82 | 22,49 | 28,45 | 24,13 | 23,9 | 25,58 | 25,69 |
| <i>JUN</i> | 25,14 | 25,47 | 25,24 | 24,14 | 24,69 | 31,13 | 25,65 | 25,41 | 26,43 | 29,24 |
| <i>LTA</i> | 35,99 | 33,61 | 32,42 | 32,95 | 33,75 | 35,18 | 32,95 | 35,64 | >40,00 | 34,12 |
| <i>LTBR</i> | 21,84 | 22,18 | 21,22 | 21,1 | 21,3 | 23,14 | 21,48 | 21,74 | 27,93 | 23,48 |
| <i>MALT1</i> | 24,63 | 25,7 | 23,99 | 26,65 | 24,57 | 37,26 | 25,45 | 27,3 | 31,91 | 32,81 |
| <i>MAP3K1</i> | 24,66 | 0 | 24,58 | 30,38 | 23,55 | 0 | 23,99 | 34,53 | 0 | 0 |
| <i>MYD88</i> | 23,99 | 24,3 | 25,61 | 24,71 | 24,59 | 24,78 | 24,12 | 25,18 | 25,41 | 26,76 |
| <i>NLRP12</i> | | 36,42 | 35,08 | 35,47 | 35,32 | 36,44 | | 0 | 0 | 0 |
| <i>NFKB1</i> | 23,57 | 24,01 | 22,71 | 23,05 | 21,72 | 23,89 | 21,82 | 24,1 | 23,46 | 25,06 |
| <i>NFKB2</i> | 29,06 | 28,96 | 28,93 | 28,21 | 28,2 | 28,33 | 29 | 28,65 | 28,39 | 29,77 |
| <i>NFKBIA</i> | 22,39 | 22,74 | 19,57 | 20,81 | 19,98 | 21,92 | 20,8 | 21,2 | 19,97 | 21,34 |
| <i>PPM1A</i> | 23,16 | 24,66 | 23,62 | 23,6 | 23,04 | 36,76 | 23,11 | 24,22 | 23,83 | 27,29 |
| <i>RAF1</i> | 24 | 23,89 | 23,89 | 23,6 | 23,72 | 24,24 | 24,26 | 25,06 | 23,86 | 25,52 |
| <i>REL</i> | 25,34 | 26,23 | 24,6 | 25,19 | 24,29 | 31,31 | 24,86 | 25,54 | 26,69 | 28,3 |
| <i>RELA</i> | 24,07 | 23,74 | 23,35 | 22,92 | 24,11 | 23,8 | 23,48 | 24,14 | 23,57 | 24,28 |
| <i>RELB</i> | 27,8 | 28,78 | 25,52 | 23,66 | 24,12 | 29,83 | 24,97 | 26,16 | 27,32 | 28,17 |
| <i>TRIM13</i> | 25,46 | 28,82 | 24,59 | 26,97 | 24,18 | 36,08 | 25,43 | 26,84 | 29,97 | 30,36 |
| <i>RHOA</i> | 19,94 | >40 | 20,44 | 24,77 | 21,07 | >40,00 | 20,7 | 24,51 | 30,92 | 32,97 |
| <i>RIPK1</i> | 25,96 | 27,04 | 27 | 25,87 | 27,19 | 26,38 | 25,34 | 26,63 | 25,81 | 29,18 |
| <i>SLC20A1</i> | 22,98 | 22,88 | 22,98 | 22,9 | 21,67 | 23,27 | 21,86 | 23,07 | 22,42 | 23,71 |
| <i>STAT1</i> | 23,96 | 23,55 | 23,78 | 23,76 | 22,51 | 23,76 | 23,01 | 23,83 | 22,89 | 24,46 |
| <i>TBK1</i> | 24,04 | 25,52 | 24,33 | 24,8 | 23,87 | 25,93 | 23,48 | 24,78 | 25,21 | 26,44 |
| <i>TICAM2</i> | 27,63 | 27,6 | 26,33 | 27,15 | 26,09 | 27,77 | 27,11 | 26,81 | 26,98 | 29,6 |
| <i>TLR1</i> | 28,09 | 29,56 | 28,17 | 29,49 | 27,59 | 32,2 | 28,25 | 29,66 | 29,85 | 32,98 |
| <i>TLR2</i> | 32,27 | 32,06 | 31,29 | 31,22 | 31,07 | 31,01 | 30,97 | 35,29 | 31,62 | 31,05 |
| <i>TLR3</i> | 27,91 | 29,49 | 28,06 | 35,85 | 28,62 | 28,86 | 27,07 | 30,26 | 33,95 | 30,34 |
| <i>TLR4</i> | 26,17 | 27,77 | 25,95 | 28,81 | 24,96 | 27,95 | 25,62 | 29,49 | 31,35 | 28,27 |
| <i>TLR6</i> | 26,27 | 36,59 | 26,09 | 28,01 | 25,92 | 28,27 | 26,24 | 28,04 | 35,7 | 29,68 |
| <i>TLR7</i> | >40 | 0 | | 33,57 | | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| <i>TLR8</i> | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| <i>TLR9</i> | 37,66 | 35,2 | 34,32 | 0 | | 35,58 | | 0 | 33,21 | 0 |
| <i>TMED4</i> | 23,09 | 23,59 | 23,08 | 22,86 | 23,54 | 23,45 | 22,87 | 23,49 | 23,35 | 24,66 |
| <i>TNF</i> | 36,45 | 38,69 | 27,93 | 30,79 | 27,85 | 36,61 | 33,2 | 30,61 | 33 | 33,24 |
| <i>TNFAIP3</i> | 28,49 | 27,85 | 22,55 | 23,37 | 22,49 | 26,04 | 24,35 | 24,31 | 23,91 | 26,51 |
| <i>TNFRSF10A</i> | 25,86 | 25,94 | 25,04 | 24,04 | 24,58 | 25,74 | 26,04 | 25,39 | 24,3 | 28,07 |
| <i>TNFRSF10B</i> | 22,98 | 23,32 | 22,57 | 21,89 | 22,16 | 24,17 | 23,45 | 22,87 | 22,84 | 24,97 |
| <i>TNFRSF1A</i> | 24,77 | 25,96 | 25,01 | 24,71 | 24,35 | 25,51 | 24,71 | 24,69 | 25,44 | 27,91 |
| <i>CD27</i> | 33,46 | 34,16 | 35,14 | 34,21 | 33,17 | 32,65 | 31,85 | 33,17 | 33,22 | 35,67 |
| <i>TNFSF10</i> | 24,98 | 29,57 | 26,83 | 29,87 | 26,89 | 28,99 | 26,09 | 30,85 | 31,65 | 31,99 |

| | Kon- trolle | Kon- trolle | IL- 1beta | IL- 1beta | TNF- alpha | TNF- alpha | IL + BAY | IL + BAY | IL + Dic 50 | IL + Dic 50 |
|----------------|----------------|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|-------------|-------------|----------------|----------------|
| <i>TNFSF14</i> | 31,79 | 30,88 | 28,6 | 27,63 | 28,53 | 28,75 | 29,25 | 27,84 | 30,7 | 30,56 |
| <i>TRADD</i> | 23,66 | 30,16 | 25,24 | 24,77 | 23,79 | 25,03 | 24,83 | 26,1 | 31,55 | >40,00 |
| <i>TICAM1</i> | 26,56 | 0 | 25,84 | 28,99 | 25,88 | 31,45 | 27,05 | 31,37 | 31,89 | 0 |
| <i>B2M</i> | 19,98 | 22,78 | 19,26 | 21,66 | 19,35 | 20,94 | 19,62 | 22,32 | 21,36 | 22,51 |
| <i>HPRT1</i> | 22,13 | 23,18 | 21,82 | 22,36 | 21,39 | 22,09 | 21,05 | 23,16 | 22,25 | 23,31 |
| <i>RPL13A</i> | 17,75 | 19,35 | 18,19 | 19,78 | 18,25 | 19,16 | 18 | 19,58 | 19,24 | 20,51 |
| <i>GAPDH</i> | 16,28 | 17,6 | 16,11 | 17,84 | 15,9 | 18,64 | 15,5 | 17,98 | 18,62 | 20 |
| <i>ACTB</i> | 15 | 17,51 | 15,07 | 17,42 | 14,82 | 19,37 | 14,66 | 18,66 | 26,72 | 19,91 |
| <i>HGDC</i> | | 0 | | 0 | | 0 | | 0 | 0 | 0 |
| <i>RTC</i> | 22,79 | 23,8 | 24,14 | 23,8 | 23,94 | 24,05 | 23,98 | 24,02 | 23,35 | 24,52 |
| <i>RTC</i> | 24,6 | 23,71 | 23,98 | 24,21 | 24,34 | 24,71 | 23,98 | 24,69 | 23,2 | 24,77 |
| <i>RTC</i> | 24,55 | 23,51 | 25,01 | 37,02 | 24,71 | 24,85 | 24,11 | 24,96 | 23,76 | 25,6 |
| <i>PPC</i> | 21,9 | 22,21 | 22,34 | 36,52 | 21,97 | 23,33 | 21,74 | 34,26 | 38,33 | 35,42 |
| <i>PPC</i> | 19,62 | 20,29 | 20,07 | 34,97 | 19,9 | 24,55 | 19,72 | 23 | 35,63 | 35,7 |
| <i>PPC</i> | 19,84 | 34,13 | 20,27 | 0 | 22,66 | 36,41 | 19,67 | 38,53 | >40,00 | 36,53 |

| | Dic 50 | Dic 50 | IL + Ibu 50 | IL + Ibu 50 | IL + Dic 1 | IL + Dic 1 | Zu- H2O | Zu- H2O | Zu- H2O free | Zu- H2O free |
|----------------|--------|--------|----------------|----------------|---------------|---------------|------------|------------|--------------------|--------------------|
| <i>AGT</i> | 32,46 | 30,51 | 32,11 | 31,47 | 32,97 | 32,58 | 30,04 | 30,86 | 31,08 | 30,29 |
| <i>AKT1</i> | 27,9 | 26,11 | 26,75 | 24,04 | 27,68 | 25,89 | 25,72 | 26,29 | 25,65 | 26,17 |
| <i>ATF1</i> | 27,58 | 24,94 | 24,02 | 24,83 | 26,49 | 25,62 | 25,69 | 26,57 | 26,7 | 26,58 |
| <i>BCL10</i> | 26,7 | 24,76 | 24,71 | 24,06 | 24,76 | 24,52 | 25,49 | 25,83 | 26,24 | 25,79 |
| <i>BCL3</i> | 29,18 | 25,61 | 25,51 | 25,06 | 26,13 | 26,19 | 25,89 | 25,15 | 26,24 | 26,16 |
| <i>CFB</i> | 29,03 | 27,23 | 23,11 | 22,15 | 23,6 | 23,53 | 23,99 | 24,61 | 24,93 | 24,89 |
| <i>BIRC2</i> | 27,47 | 25,47 | 25,63 | 24,38 | 26,79 | 25,54 | 26,19 | 26,66 | 26,69 | 26,71 |
| <i>NOD1</i> | 29,99 | 27,67 | 29,32 | 28,01 | 31,46 | 29,84 | 29,64 | 28,25 | 29,24 | 29,82 |
| <i>CASP1</i> | 31,15 | 29,82 | 29,81 | 29,25 | 29,62 | 30,28 | 30 | 29,25 | 29,65 | 29,89 |
| <i>CASP8</i> | 31,72 | 29,36 | 29,17 | 28,19 | 30,86 | 29,95 | 30,27 | 35,82 | 31,29 | 30,86 |
| <i>CCL2</i> | 29,45 | 28,15 | 23,02 | 21,99 | 24,15 | 24 | 26,25 | 25,64 | 27,12 | 26,97 |
| <i>CD40</i> | 30,2 | 28,44 | 29,56 | 28,14 | 31,52 | 29,43 | 29,7 | 28,99 | 30,23 | 30,25 |
| <i>CFLAR</i> | 29,05 | 26,09 | 25,12 | 25,59 | 26,26 | 25,05 | 25,77 | 25,93 | 25,68 | 26,27 |
| <i>CHUK</i> | 26,6 | 26,18 | 26,21 | 25,14 | 25,63 | 26,51 | 26,89 | 27,09 | 27,14 | 26,7 |
| <i>CSF2</i> | 35,05 | 32,34 | 29,99 | 28,27 | 29,99 | 30,24 | 35,46 | >40 | 36,73 | 37,66 |
| <i>CSF3</i> | >40 | 36,99 | 25,37 | 24,3 | 27,65 | 27,24 | 35,03 | 35,94 | >40,00 | >40,00 |
| <i>SLC44A2</i> | 26,87 | 25,45 | 29,12 | 28,14 | 29,89 | 28,48 | 24,34 | 24,79 | 24,31 | 24,67 |
| <i>EDARADD</i> | 28,62 | 28,18 | 27,16 | 26,45 | 28,7 | 27,33 | 28,83 | 28,89 | 28,24 | 28,78 |
| <i>LPAR1</i> | 29,02 | 26,67 | 26,21 | 25,26 | 27,74 | 27,17 | 27,48 | 28,39 | 27,91 | 27,8 |
| <i>EGR1</i> | 28 | 28,88 | 30,95 | 30,03 | 30,31 | 29,86 | 31,77 | 32,27 | 34,78 | 34,32 |
| <i>ELK1</i> | 29,24 | 28,04 | 27,29 | 28,25 | 28,97 | 28,31 | 29 | 29,15 | 29,27 | 29,1 |
| <i>F2R</i> | 27,51 | 26,93 | 26,93 | 28,26 | 28,93 | 27,8 | 27,72 | 28,12 | 27,87 | 28,11 |
| <i>FADD</i> | 27,36 | 26,2 | 26,24 | >40,00 | 28,82 | 27,01 | 27 | 27,03 | 27,24 | 27,45 |
| <i>FASLG</i> | >40 | 0 | 0 | 0 | >40,00 | [>40] | 0 | 0 | 0 | 36,45 |
| <i>FOS</i> | 27,7 | 26,93 | 28,84 | 26,78 | 29,17 | 28,45 | 27,28 | 27,86 | 27,88 | 27,79 |

| | Dic 50 | Dic 50 | IL + Ibu 50 | IL + Ibu 50 | IL + Dic 1 | IL + Dic 1 | Zu- H2O | Zu- H2O | Zu- H2O free | Zu- H2O free |
|---------|--------|--------|----------------|----------------|---------------|---------------|------------|------------|--------------------|--------------------|
| GJA1 | 25,74 | 24,11 | 23,58 | 23,23 | 24,63 | 24,04 | 24,77 | 26,44 | 25,63 | 25,53 |
| HMOX1 | 24,03 | 22,28 | 24,32 | 23,98 | 25,83 | 24,66 | 25,46 | 25,24 | 25,72 | 25,46 |
| HTR2B | 32,88 | 31,91 | 33,91 | 32,26 | 32,93 | 33,05 | 32,99 | 34,31 | 34,56 | 34,08 |
| ICAM1 | 31,24 | 29,79 | 25,63 | 25,57 | 27,22 | 26,62 | 26,52 | 26,29 | 27,15 | 27,34 |
| IFNA1 | 33,53 | 33,5 | 30,1 | 28,21 | 31,45 | 30,24 | 31,6 | 31,66 | 32,04 | 32,42 |
| IFNB1 | 34,91 | 36,05 | 36,78 | 36,81 | 35,94 | 38,11 | 35,54 | >40 | 38,14 | >40,00 |
| IFNG | 0 | 0 | >40 | 0 | >40,00 | >40,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| IKBKB | 26,76 | 26,62 | 26,09 | 29,35 | 27,65 | 27,47 | 27,89 | 26,78 | 27,68 | 27,02 |
| IKBKE | 29,35 | 28,16 | 26,11 | 29,24 | 27,74 | 26,91 | 27,88 | 26 | 27,82 | 27,63 |
| IKBKG | 28,11 | 27,3 | 27,57 | 26,78 | 29,54 | 27,84 | 26,55 | 27,52 | 27,2 | 26,93 |
| IL10 | 38,04 | >40 | 36,81 | 0 | >40,00 | 38,09 | 0 | 0 | 0 | >40,00 |
| IL1A | 30,81 | 30,27 | 28,67 | 30,8 | 29,18 | 29,64 | 28,91 | 29,1 | 30,58 | 29,86 |
| IL1B | 30,29 | 29,69 | 27,8 | 37,2 | 29,02 | 29,12 | 29,29 | 30,01 | 30,61 | 30,15 |
| IL1R1 | 28,66 | 27,97 | 26,96 | 26,2 | 29,47 | 27,21 | 27,54 | 26,96 | 27,14 | 27,22 |
| IL6 | 29,8 | 28,66 | 23,48 | 23,67 | 24,77 | 24,96 | 28,9 | 29,24 | 30,08 | 30,11 |
| IL8 | 24,8 | 25,62 | 19,15 | 22,54 | 20,52 | 20,24 | 23,44 | 23,76 | 24,66 | 24,57 |
| IRAK1 | 25,14 | 27,47 | 26,72 | 24,62 | 29,46 | 26,49 | 26,11 | 26,03 | 25,76 | 26,7 |
| IRAK2 | 26,45 | 27,12 | 25,06 | 25,08 | 26,11 | 24,59 | 24,92 | 26,66 | 26,61 | 25,81 |
| JUN | 26,16 | 27,47 | 28,08 | 26,04 | 29,11 | 27,13 | 28,69 | 29,07 | 29,22 | 29,65 |
| LTA | 33,78 | 33,43 | 33,57 | 35,42 | 36,81 | 37,45 | 34,59 | 0 | 38,06 | 35,22 |
| LTBR | 22,37 | 23,88 | 23,83 | 22,88 | 25,07 | 24,7 | 24,33 | 24,49 | 23,96 | 24,7 |
| MALT1 | 27,18 | 26,72 | 26,78 | 32,94 | 27,6 | 27,13 | 27,7 | 27,43 | 28,05 | 27,51 |
| MAP3K1 | 26,84 | 27,69 | 27,3 | 0 | 27,58 | 27,8 | 26,8 | 27,72 | 27,48 | 27,62 |
| MYD88 | 26,79 | 26,79 | 26,15 | 26,95 | 27,55 | 26,07 | 26,2 | 26,52 | 26,31 | 26,6 |
| NLRP12 | 0 | 38,96 | >40 | 35,05 | >40,00 | >40,00 | 16,59 | 0 | 28,16 | 27,94 |
| NFKB1 | 25,92 | 25,56 | 24,64 | 23,2 | 24,62 | 25,1 | 25,13 | 24,99 | 25,52 | 25,44 |
| NFKB2 | 30,98 | 30,77 | 29,88 | 29,5 | 31,5 | 31,05 | 30,13 | 30,3 | 30,74 | 30,63 |
| NFKBIA | 23,62 | 23,6 | 20,97 | 20,46 | 21,19 | 21,88 | 23,47 | 23,75 | 23,62 | 23,32 |
| PPM1A | 26,02 | 24,68 | 24,06 | 24,49 | 25,53 | 25,91 | 25,94 | 25,8 | 25,94 | 25,74 |
| RAF1 | 25,86 | 26,01 | 25,72 | 24,74 | 26,57 | 25,08 | 26,01 | 26,26 | 25,98 | 25,67 |
| REL | 29,52 | 27,86 | 26,87 | 29,73 | 28,01 | 26,22 | 26,65 | 27,18 | 26,3 | 27,17 |
| RELA | 26,34 | 25,27 | 25,19 | 24,75 | 25,94 | 26,32 | 25,2 | 25,51 | 25,12 | 24,95 |
| RELB | 29,34 | 30,53 | 27,9 | 33,25 | 30,17 | 27,89 | 26,65 | 27,78 | 28,8 | 28,84 |
| TRIM13 | 26,56 | 27,58 | 26,87 | 0 | 28,45 | 27,61 | 27,71 | 28,2 | 27,98 | 27,97 |
| RHOA | 23,89 | 23,77 | 22,47 | >40,00 | 24,31 | 23,99 | 24,24 | 24,43 | 24,07 | 24,13 |
| RIPK1 | 28,05 | 27,51 | 27,88 | 26,84 | 29,99 | 28,53 | 27,06 | 28,34 | 28,15 | 27,92 |
| SLC20A1 | 23,37 | 23,36 | 23,75 | 26,04 | 24,98 | 24,19 | 23,99 | 25,32 | 24,8 | 24,74 |
| STAT1 | 25,23 | 24,71 | 24,88 | 24,09 | 25,69 | 24,33 | 24,88 | 24,16 | 25,03 | 25,13 |
| TBK1 | 25,72 | 25,9 | 25,78 | 25,06 | 25,3 | 26,15 | 26,85 | 26,24 | 26,77 | 26,1 |
| TICAM2 | 28,07 | 28,85 | 27,46 | 27,51 | 28,51 | 28 | 28,22 | 28,71 | 28,99 | 28,56 |
| TLR1 | 30,21 | 29,93 | 27,94 | 34,34 | 28,67 | 29,15 | 31,84 | 31,76 | 32,06 | 31,99 |
| TLR2 | 32,64 | 32,54 | 32,8 | 36,85 | 33,24 | 31,34 | 32,14 | 32,76 | 32,82 | 31,73 |
| TLR3 | 30,66 | 29,5 | 29,46 | 30,7 | 30,58 | 28,94 | 29,43 | 29,73 | 29,79 | 29,83 |

| | Dic 50 | Dic 50 | IL + Ibu 50 | IL + Ibu 50 | IL + Dic 1 | IL + Dic 1 | Zu- H2O | Zu- H2O | Zu- H2O free | Zu- H2O free |
|------------------|--------|--------|----------------|----------------|---------------|---------------|------------|------------|--------------------|--------------------|
| <i>TLR4</i> | 29,31 | 29,27 | 27,69 | 29,39 | 29,81 | 29,34 | 29,34 | 29,68 | 28,94 | 29,8 |
| <i>TLR6</i> | 28,34 | 28,21 | 27,8 | 34,86 | 28,2 | 27,99 | 27,78 | 28,12 | 27,25 | 27,73 |
| <i>TLR7</i> | >40 | >40 | >40 | 0 | >40.00 | >40.00 | 37,7 | 39,43 | >40.00 | 38,91 |
| <i>TLR8</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | [>40] | 0 | 0 | 38,6 | 0 | 0 |
| <i>TLR9</i> | [>40] | 39,33 | 36,73 | 0 | 34,85 | 33,81 | 32,54 | 35,02 | 33,52 | 34,02 |
| <i>TMED4</i> | 24,7 | 24,66 | 25,13 | 24,23 | 25,48 | 23,98 | 24,17 | 25,44 | 24,45 | 24,76 |
| <i>TNF</i> | 35,32 | 37,11 | 29,89 | 31,25 | 31,24 | 31,09 | 34,31 | 33,78 | 35,71 | 35,01 |
| <i>TNFAIP3</i> | 30,36 | 29,03 | 24,13 | 24,58 | 24,11 | 23,72 | 26,94 | 26,92 | 27,83 | 27,74 |
| <i>TNFRSF10A</i> | 26,71 | 27,04 | 26,28 | 25,73 | 28,45 | 26,6 | 27,74 | 27,69 | 28,11 | 28,16 |
| <i>TNFRSF10B</i> | 24,51 | 23,28 | 22,22 | 23,93 | 23,87 | 23,12 | 24,76 | 25,03 | 24,07 | 25,07 |
| <i>TNFRSF1A</i> | 22,63 | 21,63 | 22,45 | 25,58 | 22,49 | 22,2 | 26,8 | 27,59 | 28,34 | 27,94 |
| <i>CD27</i> | 33,01 | 32,96 | 35,62 | 36,79 | 35,3 | 32,73 | 33,13 | 35,56 | 34 | 35,73 |
| <i>TNFSF10</i> | 29,2 | 30,19 | 29,91 | 31,39 | 30,27 | 30,7 | 30,22 | 30,23 | 28,71 | 29,5 |
| <i>TNFSF14</i> | 32,1 | 32,31 | 28,22 | 29,8 | 29,61 | 28,07 | 29,84 | 30,67 | 29,69 | 30,01 |
| <i>TRADD</i> | 25,03 | 26,07 | 25,85 | 26,83 | 27,05 | 25,55 | 26,68 | 25,95 | 26,87 | 26,69 |
| <i>TICAM1</i> | 27,44 | 27,77 | 27,53 | >40.00 | 27,11 | 26,92 | 28,88 | 29,55 | 29,68 | 29,44 |
| <i>B2M</i> | 25,95 | 21,66 | 19,76 | 22,29 | 21,02 | 21,3 | 22,27 | 22,76 | 22,02 | 22,73 |
| <i>HPRT1</i> | 24,03 | 21,77 | 22,22 | 23,83 | 21,59 | 22,06 | 22,16 | 24,05 | 23,61 | 23,64 |
| <i>RPL13A</i> | 19,25 | 19,2 | 19,01 | 20,49 | 18,34 | 19,68 | 20,34 | 20,57 | 20 | 20,64 |
| <i>GAPDH</i> | 22,96 | 17,27 | 17,73 | 18,57 | 17,35 | 16,55 | 19,2 | 19,05 | 19,03 | 18,79 |
| <i>ACTB</i> | 31,97 | 19,37 | 17,91 | 18,31 | 18,03 | 18 | 18,52 | 19,01 | 19,7 | 19,58 |
| <i>HGDC</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | >40.00 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>RTC</i> | 27,93 | 23,97 | 23,1 | 24,65 | 22,12 | 23,04 | 24,95 | 25,05 | 24,94 | 25,52 |
| <i>RTC</i> | 26,91 | 23,45 | 22,89 | 27,35 | 21,5 | 22,32 | 25,59 | 25,69 | 24,86 | 25,06 |
| <i>RTC</i> | 27,5 | 23,16 | 22,95 | 26,08 | 21,49 | 22,98 | 25,74 | 24,74 | 25,42 | 25,14 |
| <i>PPC</i> | 26,92 | 19,95 | 19,81 | 23,95 | 20,5 | 19,92 | 21,52 | 22,11 | 22,5 | 22,32 |
| <i>PPC</i> | 24,12 | 20,11 | 19,92 | 23,18 | 19,87 | 19,93 | 18,98 | 19,79 | 20,12 | 19,91 |
| <i>PPC</i> | 26,37 | 20,07 | 19,86 | >40.00 | 20,51 | 19,85 | 19,72 | 20,18 | 20,33 | 20,27 |

6.2.2 Custom-made RT²Profiler™ PCR Array

| | CASP 8 | SLC4 4A2 | IKBK E | IL6 | MALT 1 | MAP3 K1 | TLR2 | TLR6 | TNFR SF1A | TICA M1 | HPRT 1 | RPL1 3A | HGD C | RTC | RTC | PPC |
|-----------------|-----------|-------------|-----------|-------|-----------|------------|-------|-------|--------------|------------|-----------|------------|----------|-------|-------|-------|
| SF | 0 | 29,87 | 35,43 | 0 | 0 | >40 | 37,24 | 34,96 | 23,96 | 28,15 | 21,09 | 18,78 | 0 | 20,51 | 23,26 | 32,28 |
| SF | 0 | 35,84 | 29,72 | >40 | 0 | 38,34 | 35,78 | 33,56 | 23,87 | 29,51 | 21,9 | 19,11 | 37,73 | 21,13 | 21,48 | 22,63 |
| SF | [>40] | 33,51 | 29,76 | 38,64 | 33,19 | 33,19 | >40 | 31,66 | 25,1 | 30,7 | 24,08 | 21,13 | 0 | 21,79 | 22,18 | 23,19 |
| IL-1 | [>40] | 35,08 | 29,89 | 30,45 | 29,82 | 31,72 | >40 | 30,59 | 24,28 | 29,69 | 22,93 | 21,42 | 36,9 | 21,75 | 21,5 | 21,87 |
| IL-1 | 33,58 | 32,64 | 30,03 | 28,6 | 28,95 | 30,54 | 39,27 | 30,42 | 23,89 | 29 | 23,16 | 20,56 | 37,16 | 22,15 | 21,68 | 20,3 |
| IL-1 | 36,48 | 32,18 | 29,9 | 26,9 | 27,84 | 29,74 | >40 | 30,03 | 23,17 | 29,07 | 22,89 | 20,72 | >40 | 22,24 | 22,34 | 19,94 |
| IL-1 + BAY | 0 | 34,85 | 31,31 | 34,31 | 30,84 | 35,76 | >40. | 31,48 | 24,15 | 30,45 | 23,56 | 21,69 | 0 | 21,57 | 21,98 | 21,73 |
| IL-1 + BAY | 32,47 | 32,82 | 30,94 | 28,5 | 29,26 | 32,18 | 34,48 | 32,09 | 25,07 | 29,76 | 23,79 | 21,3 | >40 | 22,06 | 21,26 | 20,42 |
| IL + Dic K1 | 35,16 | 30,78 | 32,63 | 29,55 | 30,66 | 32,13 | >40 | 32,05 | 25,83 | 30,25 | 24,77 | 22,19 | >40 | 24,18 | 23,1 | 20 |
| IL + Dic K1 | 34,76 | 30,5 | 32,06 | 29,75 | 32,22 | 32,83 | 34,32 | 32,42 | 26,29 | 30,22 | 24,93 | 23,89 | 37,15 | 24,07 | 24,5 | 20,08 |
| IL + Dic K2 | 33,65 | 31,89 | 30,54 | 30,77 | 31,53 | 33,99 | >40 | 31,5 | 26,94 | 29,58 | 23,96 | 21,89 | 35,9 | 22,58 | 22,19 | 20,28 |
| IL + Dic K2 | 31,68 | 30,97 | 29,19 | 26,99 | 27,88 | 32,59 | 35,19 | 29,92 | 23,75 | 29,59 | 24,14 | 22,05 | 37,08 | 23,84 | 22,74 | 20,34 |
| IL + Dic K3 | 36,78 | 32,44 | 31,18 | 27 | 30,7 | 32,55 | 35,77 | 31,72 | 25,9 | 29,44 | 24,97 | 22,67 | 38,07 | 22,66 | 22,8 | 20,98 |
| IL + Dic K3 | 32,14 | 33,09 | 29,9 | 28,08 | 29,59 | 31,92 | >40 | 31,06 | 25,09 | 29,32 | 24,37 | 22,1 | 36,77 | 22,94 | 22,01 | 20,34 |
| IL + Dic K4 | 33,68 | 32,63 | 30,92 | 29,76 | 30,23 | 33,59 | >40 | 30,97 | 25,65 | 29,61 | 25,68 | 21,67 | 37,83 | 23,01 | 22,86 | 21,2 |
| IL + Dic K4 | 30,91 | 32,19 | 29,07 | 27,06 | 28,63 | 31,02 | 34,8 | 29,93 | 24,96 | 28,95 | 23,78 | 21,84 | 34,89 | 23,04 | 22,86 | 19,93 |
| IL + Dic K5 | 32,47 | 32 | 29,49 | 27,67 | 28,67 | 31,58 | 36,17 | 30,97 | 24,96 | 29,68 | 24,74 | 21,04 | 38,99 | 24,03 | 22,92 | 20,68 |
| IL + Dic K5 | 32,83 | 31,5 | 30,74 | 28,64 | 29,82 | 31,32 | >40 | 30,75 | 24,51 | 30,04 | 25,61 | 21,62 | >40 | 23,05 | 22,21 | 21,36 |
| IL + Dic K6 | 33,26 | 30,82 | 29,65 | 27,58 | 28,71 | 31,55 | >40 | 30,88 | 24,28 | 29,19 | 23,46 | 21,2 | 37,43 | 24 | 23,75 | 20,61 |
| IL + Dic K6 | 32,79 | 31,8 | 29,3 | 27,64 | 28,43 | 32,8 | >40 | 31 | 24,9 | 29,77 | 24,08 | 21,13 | 37,36 | 23,32 | 23,03 | 20,75 |
| IL + Dic K7 | 32,05 | 30,86 | 28,78 | 28,02 | 28,99 | 32,02 | >40 | 30,9 | 24,75 | 29,48 | 24,14 | 21,14 | 35,68 | 23,35 | 23,66 | 20,1 |
| IL + Dic K7 | 34,16 | 31,49 | 30,46 | 29,18 | 30,55 | 31,92 | >40 | 30,67 | 26 | 29,86 | 24,86 | 22,21 | 37,44 | 23,34 | 23,23 | 19,99 |
| IL + Dic K8 | 32,29 | 31,45 | 28,76 | 28,05 | 27,44 | 31,56 | 34,5 | 30,62 | 23,98 | 29,76 | 23,01 | 21,74 | 35,11 | 23,27 | 23,56 | 19,86 |
| IL + Dic K8 | 32,13 | 32,24 | 30,63 | 28,61 | 30,76 | 34,25 | >40 | 32,67 | 27,22 | 32,06 | 25,3 | 22,72 | 38,81 | 24,31 | 24,1 | 20,85 |
| IL + Dic K9 | 34,67 | 33,2 | 30,14 | 30,16 | 30,51 | 35,88 | >40 | 31,69 | 27,3 | 29,75 | 25,74 | 23,04 | 37,29 | 23,77 | 23,87 | 20,31 |
| IL + Dic K9 | 34,23 | 33,15 | 30,87 | 29,24 | 30,31 | 32,74 | >40 | 31,14 | 27,46 | 30,34 | 25,84 | 23,53 | 38,19 | 24,48 | 23,22 | 20,83 |
| IL + Dic K10 | 33,95 | 31,92 | 30,58 | 27,88 | 28,82 | 32,6 | >40 | 31,7 | 25,76 | 30,99 | 25,18 | 23,31 | 39,35 | 24,98 | 25,16 | 20,33 |
| IL + Dic K10 | 35,01 | 32,68 | 31,64 | 30,33 | 29,98 | 32,35 | 36,72 | 31,27 | 25,45 | 30,45 | 24,6 | 23,21 | >40 | 24,05 | 23,73 | 20,53 |
| IL + Ibu K1 | 33,24 | 32,27 | 31,23 | 29,09 | 30,97 | 33,19 | >40 | 31,49 | 26,01 | 29,59 | 24,85 | 22,95 | 35,32 | 23,24 | 23,1 | 20,63 |
| IL + Ibu K1 | 34,03 | 32,26 | 30,2 | 27,62 | 29,07 | 32,83 | 39,49 | 31,08 | 25,53 | 30,32 | 25,04 | 21,73 | >40 | 24,89 | 24,66 | 20,59 |
| IL + Ibu K2 | 34,49 | 32,67 | 30,19 | 29,44 | 28,54 | 31,27 | >40 | 31,02 | 26,18 | 30,14 | 24,56 | 21,72 | >40 | 23,1 | 22,78 | 20,7 |
| IL + Ibu K2 | 34,24 | 33,54 | 29,93 | 29,44 | 28,95 | 32,95 | >40 | 32,89 | 24,54 | 30,15 | 24,18 | 20,95 | 39,28 | 22,92 | 23,24 | 20,94 |
| IL + Ibu K3 | 39,53 | 34,09 | 31,43 | 29,73 | 30,19 | 31,65 | >40 | 31,69 | 25,44 | 30,81 | 25,49 | 22,32 | >40 | 23,05 | 22,99 | 21,08 |
| IL + Ibu K3 | 34,19 | 31,95 | 29,16 | 28,89 | 29,29 | 31,11 | >40 | 30,24 | 24,81 | 28,8 | 23,03 | 20,03 | >40 | 22,14 | 21,67 | 20,5 |
| IL + Ibu K4 | 32,65 | 32,77 | 31,06 | 30,18 | 29,65 | 30,99 | >40 | 30,62 | 24,29 | 29,6 | 23,55 | 20,79 | >40 | 22,84 | 22,99 | 21,01 |
| IL + Ibu K4 | 33,25 | 32,67 | 30,24 | 28,58 | 29,86 | 30,79 | 35,81 | 31,88 | 24,82 | 29,82 | 23,72 | 21,28 | >40 | 23,01 | 22,74 | 20,44 |
| IL + Ibu K5 | 34,96 | 33,78 | 30,65 | 30,14 | 30,36 | 31,31 | 35,62 | 31,23 | 25,52 | 30,69 | 24,59 | 21,64 | 38,16 | 23,48 | 23,7 | 20,95 |
| IL + Ibu K5 | 31,48 | 31,63 | 29,7 | 28,01 | 28,26 | 29,97 | 36,13 | 29,98 | 24,64 | 29,3 | 23,33 | 20,85 | 37,63 | 22,71 | 22,19 | 20,32 |
| IL + Ibu K6 | 36,72 | 32,84 | 31,24 | 30,94 | 30,92 | 32,97 | 35,62 | 31,88 | 25,64 | 29,05 | 25,6 | 22,76 | 39,58 | 24,26 | 23,12 | 20,95 |

| | CASP 8 | SLC4 4A2 | IKBK E | IL6 | MALT 1 | MAP3 K1 | TLR2 | TLR6 | TNFR SF1A | TICA M1 | HPRT 1 | RPL1 3A | HGD C | RTC | RTC | PPC |
|--------------------|-----------|-------------|-----------|-------|-----------|------------|-------|-------|--------------|------------|-----------|------------|----------|-------|-------|-------|
| IL + Ibu K6 | 34,2 | 32,96 | 31,46 | 30,67 | 29,87 | 34,82 | >40 | 31,75 | 25,82 | 30,76 | 26,05 | 22,17 | >40 | 23,1 | 22,63 | 21,19 |
| IL + Ibu K7 | 32,32 | 31,27 | 29,85 | 27,84 | 27,87 | 30,93 | >40 | 30,03 | 24,52 | 29,6 | 23,58 | 21,33 | 38,82 | 23,67 | 23,36 | 20,22 |
| IL + Ibu K7 | 33,53 | 33,04 | 29,92 | 28,66 | 28,78 | 31,31 | >40 | 31,23 | 25,25 | 31,25 | 24,6 | 21,64 | 38,29 | 23,31 | 23,44 | 20,69 |
| IL + Ibu K8 | 32,56 | 30,6 | 28,7 | 28,1 | 28,17 | 30,56 | >40 | 29,66 | 23,99 | 29,16 | 22,9 | 20,65 | >40 | 22,78 | 22,45 | 20,25 |
| IL + Ibu K8 | 31,63 | 30,04 | 30,49 | 27,97 | 28,34 | 30,5 | 35,3 | 30,25 | 23,76 | 30,21 | 23,65 | 21,31 | >40 | 23,61 | 23,32 | 20,67 |
| IL + Ibu K9 | 32,65 | 31,95 | 30,23 | 27,77 | 28,14 | 30,73 | 38,51 | 30,29 | 24,43 | 29,61 | 23,91 | 21,32 | 37,42 | 23,14 | 22,62 | 20,68 |
| IL + Ibu K9 | 30,1 | 31,11 | 28,84 | 27,56 | 27,32 | 29,86 | >40 | 30,16 | 24,71 | 29,62 | 23,73 | 21,15 | 34,75 | 23,27 | 23,06 | 20,3 |
| IL + Ibu K10 | 31,19 | 31,15 | 28,5 | 26,75 | 26,98 | 30,48 | 33,75 | 29,6 | 23,7 | 30,02 | 22,89 | 20,8 | >40 | 23,22 | 23,23 | 20,48 |
| IL + Ibu K10 | 30,64 | 31,76 | 28,98 | 27,27 | 27,64 | 29,76 | 35,01 | 30,01 | 23,7 | 29,29 | 23,26 | 20,93 | 37,79 | 23,47 | 23,75 | 20,21 |
| Dic K1 | >40 | 31,54 | 31,7 | 35,89 | 30,58 | 33,09 | >40 | 32,14 | 25,49 | 30,12 | 23,75 | 21,14 | >40 | 22,55 | 22,53 | 19,89 |
| Dic K1 | 36,26 | 29,59 | 32,55 | 37,95 | 30,26 | 34,5 | >40 | 31,93 | 24,89 | 30,47 | 24,49 | 21,73 | >40 | 23 | 22,25 | 20,45 |
| Dic K2 | 0 | 34,07 | 29,68 | >40 | 33,3 | 33,91 | >40 | 32,96 | 24,34 | 30,13 | 21,82 | 19,5 | >40 | 21,99 | 22,29 | 22,61 |
| Dic K2 | 33,39 | 31,21 | 31,9 | 35,66 | 29,3 | 32,71 | >40 | 31 | 24,1 | 30,23 | 23,16 | 20,9 | >40 | 22,22 | 22,07 | 19,91 |
| Dic K3 | 32,67 | 30,53 | 32,89 | 36,13 | 28,55 | 32,33 | >40 | 31,55 | 24,93 | 30,07 | 23,7 | 21,62 | >40 | 23,74 | 23,3 | 19,79 |
| Dic K3 | 32,65 | 32,53 | 31,65 | 35,1 | 30,76 | 37,62 | >40 | 32,31 | 26,65 | 30,46 | 24,37 | 22,3 | >40 | 23,33 | 22,56 | 19,78 |
| Dic K4 | 32,71 | 31,66 | 31,52 | 34,14 | 28,98 | 32,27 | >40 | 31,81 | 24,58 | 30,75 | 23,27 | 22,27 | >40 | 23,55 | 24,34 | 19,65 |
| Dic K4 | 33,21 | 33,75 | 32,9 | 35 | 29,91 | 33,34 | 35,03 | 32,53 | 25,29 | 30,15 | 22,83 | 20,68 | >40 | 22,23 | 22,06 | 19,54 |
| Dic K5 | 33,3 | 32,83 | 31,66 | 36,81 | 29,72 | 33,14 | >40 | 30,58 | 24,52 | 29,11 | 22,82 | 20,78 | >40 | 23,57 | 23,47 | 19,61 |
| Dic K5 | 33,09 | 32,73 | 32 | 38,73 | 29,87 | 33,62 | >40 | 32,75 | 25,6 | 31,46 | 24,5 | 21,8 | >40 | 23,72 | 23,95 | 19,77 |
| Dic K6 | 32,49 | 32,91 | 32,21 | 37,59 | 29,51 | 34,87 | >40 | 32,95 | 26,49 | 30,57 | 24,03 | 21,87 | >40 | 23,52 | 22,82 | 20,25 |
| Dic K6 | 32 | 32,02 | 32,01 | 35,27 | 29,49 | 35,42 | >40 | 32,29 | 24,98 | 30,79 | 24,07 | 22,57 | 0 | 24,25 | 23,98 | 19,93 |
| Dic K7 | 32,36 | 32,15 | 32,73 | 35,04 | 31,6 | 34,1 | >40 | 32,29 | 26,78 | 30,6 | 25,24 | 21,83 | 33,49 | 24,59 | 24,03 | 20,89 |
| Dic K7 | 35,64 | 31,69 | 31,56 | 34,85 | 30,2 | 34,65 | >40 | 32,56 | 26,35 | 31,07 | 25,3 | 23,94 | >40 | 24,83 | 23,74 | 20,06 |
| Dic K8 | 33,56 | 31,69 | 31,71 | 33,87 | 30,47 | 32,56 | >40 | 32,63 | 25,31 | 30,32 | 23,39 | 22,42 | >40 | 23,78 | 23,47 | 19,86 |
| Dic K8 | 31,95 | 31,59 | 32,21 | 33,54 | 30,09 | 33,61 | 36,9 | 32,67 | 26,12 | 30,33 | 25,11 | 22,27 | >40 | 23,19 | 23,85 | 19,92 |
| Dic K9 | 33,57 | 30,6 | 31,51 | 33,96 | 29,59 | 32,62 | >40 | 32,46 | 26,56 | 30,36 | 23,72 | 21,5 | >40 | 22,47 | 22,91 | 19,62 |
| Dic K9 | 33 | 30,5 | 30,64 | 35,75 | 29,27 | 32,91 | >40 | 32,19 | 26,27 | 30,1 | 22,94 | 21,79 | >40 | 23,06 | 23,06 | 19,28 |
| Dic K10 | 31,62 | 30,97 | 31,43 | 33,88 | 30,13 | 33,59 | >40 | 31,5 | 25,12 | 30,57 | 22,61 | 21,91 | 38,06 | 24,03 | 22,79 | 19,62 |
| Dic K10 | 33,15 | 30,73 | 31,47 | 36,4 | 28,51 | 31,71 | >40 | 31,1 | 24,53 | 29,91 | 22,98 | 21,03 | >40 | 23,63 | 23,29 | 19,9 |
| Ibu K1 | 31,97 | 30,9 | 31,23 | 33,34 | 29,45 | 32,61 | 34,79 | 31,49 | 25,26 | 30,26 | 23,28 | 21,23 | >40 | 23,43 | 23,01 | 19,62 |
| Ibu K1 | 31,68 | 31,54 | 32,35 | 35,16 | 29,76 | 34,75 | 36,75 | 32,99 | 25,11 | 30,84 | 24,82 | 22,62 | 39 | 25,71 | 23,87 | 20,28 |
| Ibu K2 | 34,75 | 31,49 | 31,25 | 32,73 | 28,65 | 32,13 | 35,84 | 30,62 | 25,57 | 29,69 | 23,62 | 22,02 | 37,67 | 23,73 | 22,53 | 0 |
| Ibu K2 | 33,99 | 32,19 | 31,76 | 35,34 | 30,88 | 35,82 | 35,7 | 32,96 | 26,32 | 30,23 | 24,55 | 22,68 | 38,38 | 24,09 | 23,3 | 20,22 |
| Ibu K3 | 32,74 | 31,01 | 31,77 | 34 | 29,22 | 32,74 | >40 | 31,65 | 24,64 | 29,78 | 23,77 | 21,23 | >40 | 24,06 | 23,51 | 20,01 |
| Ibu K3 | 32,7 | 31,82 | 30,01 | 35,01 | 29,55 | 32,9 | >40 | 32,58 | 25,45 | 30,12 | 25,07 | 23,27 | 37,88 | 25,03 | 24,02 | 20,12 |
| Ibu K4 | 34,44 | 31,93 | 32,03 | 34,56 | 29,72 | 32,42 | >40 | 31,97 | 25,5 | 30,12 | 23,75 | 21,51 | >40 | 23,5 | 23,12 | 20 |
| Ibu K4 | 34,06 | 31,29 | 31,05 | 33,43 | 29,08 | 32,74 | >40 | 31,14 | 25,16 | 29,9 | 23,99 | 22,86 | >40 | 23,93 | 23,12 | 19,85 |
| Ibu K5 | 30,61 | 31,63 | 31,28 | 34,47 | 28,84 | 31,21 | >40 | 31,55 | 24,24 | 29,99 | 23,49 | 21,5 | >40 | 23,43 | 23,44 | 20,57 |
| Ibu K5 | 30,76 | 30,82 | 32 | 33,7 | 28,08 | 31,09 | >40 | 31,53 | 23,7 | 30,61 | 23,99 | 21,85 | >40 | 24,18 | 24,21 | 20,08 |
| Ibu K6 | 33,35 | 33,18 | 32,56 | 35,16 | 30,77 | 34,8 | >40 | 32,22 | 25,64 | 31,01 | 24,25 | 21,87 | >40 | 24,01 | 24,28 | 20,32 |
| Ibu K6 | 32,61 | 31,1 | 31,64 | 33,63 | 29,64 | 33,67 | >40 | 32,66 | 25,31 | 31,07 | 24,17 | 21,94 | >40 | 24,57 | 23,52 | 19,91 |
| Ibu K7 | 32,61 | 31,99 | 30,91 | 34,02 | 29,49 | 32,95 | >40 | 31,2 | 25,86 | 29,67 | 24,29 | 22,21 | 36,17 | 23,49 | 23,65 | 19,55 |

| | CASP 8 | SLC4 4A2 | IKBK E | IL6 | MALT 1 | MAP3 K1 | TLR2 | TLR6 | TNFR SF1A | TICA M1 | HPRT 1 | RPL1 3A | HGD C | RTC | RTC | PPC |
|-------------------|-----------|-------------|-----------|-------|-----------|------------|-------|-------|--------------|------------|-----------|------------|----------|-------|-------|-------|
| Ibu K7 | 32,96 | 32,74 | 31,53 | 34,85 | 31,05 | 34,14 | >40 | 32,22 | 27,14 | 30,81 | 24,72 | 21,95 | >40 | 23,62 | 23,05 | 19,63 |
| Ibu K8 | 33,71 | 31,78 | 30,95 | 35,11 | 28,23 | 32,94 | >40 | 31,43 | 25,96 | 30,48 | 23,48 | 21,79 | >40 | 23,49 | 23,11 | 19,49 |
| Ibu K8 | 33,63 | 31,56 | 31,52 | 33,91 | 29,02 | 32,03 | 34,89 | 30,81 | 25,31 | 30,58 | 23,11 | 21,82 | >40 | 23,89 | 23,95 | 19,45 |
| Ibu K9 | 34,3 | 32,14 | 31,6 | 34,12 | 31,98 | 34,3 | >40 | 31,58 | 26,57 | 30 | 25,09 | 22,24 | >40 | 23,61 | 22,98 | 19,55 |
| Ibu K9 | 33,6 | 33,98 | 31,98 | 34,48 | 31,58 | 33,8 | >40 | 31,7 | 28,33 | 29,69 | 24,38 | 23,71 | >40 | 22,44 | 22,56 | 19,9 |
| Ibu K10 | 33,21 | 32,29 | 31,78 | 35,01 | 30,91 | 31,49 | >40 | 31,17 | 26,02 | 30,68 | 24,65 | 21,59 | 37,22 | 23,14 | 23,54 | 19,91 |
| Ibu K10 | 34,84 | 32,67 | 31,47 | 35,79 | 30,43 | 33,66 | >40 | 33,02 | 26,75 | 29,93 | 24,23 | 21,84 | 38,14 | 24 | 23,03 | 19,8 |
| dest. 1:2 | 31,96 | 27,8 | 31,09 | 34,17 | 30,33 | 33,74 | >40 | 31,27 | 25,69 | 29,82 | 22,45 | 20,33 | >40 | 22,69 | 22,13 | 19,8 |
| dest. 1:2 | 32,69 | 27,72 | 31,87 | 34,8 | 31,21 | 34,24 | >40 | 31,74 | 26,19 | 30,92 | 22,78 | 20,26 | >40 | 21,54 | 21,15 | 20 |
| dest. 1:4 | 33,22 | 31,66 | 31,69 | 35,93 | 30,45 | 33,33 | >40 | 31,85 | 26,44 | 29,78 | 23,87 | 21,57 | >40 | 22,73 | 22,21 | 19,87 |
| dest. 1:4 | 34,71 | 30,93 | 32,17 | 35,58 | 28,71 | 33,53 | >40 | 31,62 | 24,04 | 30,72 | 22,59 | 21,19 | >40 | 23,43 | 23,09 | 20,03 |
| Zulauf 1:2 | 33,06 | 28,33 | 30,7 | 31,74 | 30,61 | 32,62 | >40 | 30,79 | 26,07 | 30,58 | 23,15 | 21,16 | 35,96 | 23,01 | 22,34 | 19,86 |
| Zulauf 1:2 | 34,21 | 29,68 | 30,04 | 32,32 | 30,76 | 31,88 | 34,01 | 30,69 | 26 | 30,58 | 24,12 | 21,72 | 34,64 | 23,54 | 23,34 | 19,97 |
| Zulauf 1:4 | 31,87 | 29,09 | 30,26 | 32,85 | 28,75 | 30,06 | >40 | 31,52 | 24,24 | 30,02 | 23,95 | 21,62 | >40 | 24,18 | 23,13 | 20,49 |
| Zulauf 1:4 | 33,14 | 30,21 | 30,1 | 33,1 | 29,21 | 32,86 | 36,99 | 30,48 | 25,17 | 30,51 | 23,64 | 21,31 | 36,93 | 23,79 | 22,62 | 20,33 |
| Zu free 1:2 | 33,62 | 28,5 | 31,01 | 33,08 | 30,58 | 32,45 | 38,08 | 31,71 | 26,49 | 30,96 | 25,18 | 22,3 | 38,24 | 24,35 | 23,57 | 21,01 |
| Zu free 1:2 | 33,98 | 29,79 | 30,26 | 33,5 | 30,51 | 34,02 | 35,43 | 30,98 | 26,69 | 29,99 | 23,31 | 21,59 | 37,33 | 22,94 | 22,11 | 20,04 |
| Zu free 1:4 | 34,78 | 31,34 | 30,15 | 34,48 | 29,85 | 33,24 | >40 | 31,56 | 26,25 | 30,14 | 24,39 | 22,58 | 36,95 | 23,96 | 22,63 | 20,53 |
| Zu free 1:4 | 33,65 | 30,89 | 30,31 | 35 | 29,6 | 31,82 | 35,76 | 31,02 | 25,97 | 30,07 | 24,34 | 21,91 | 39,2 | 23,49 | 22,79 | 20,13 |
| Ablauf 1:2 | 34,54 | 29,61 | 31,48 | 34,57 | 31,57 | 34,22 | 35,26 | 30,91 | 26,63 | 30,09 | 23,64 | 21,91 | >40 | 23,77 | 22,68 | 21,03 |
| Ablauf 1:2 | 31,29 | 27,77 | 30,91 | 34,17 | 29,26 | 31,63 | >40 | 30,74 | 24,92 | 30,04 | 23,26 | 20,95 | 37,38 | 24,49 | 23,87 | 20,45 |
| Ablauf 1:4 | 34,36 | 29,82 | 32,16 | 34,17 | 30,07 | 32,77 | >40 | 30,98 | 25,55 | 29,9 | 24,57 | 21,8 | 38,75 | 24,29 | 24,06 | 20,74 |
| Ablauf 1:4 | 33,01 | 31,58 | 31,74 | 33,55 | 29,3 | 32,01 | >40 | 30,71 | 25,74 | 30,06 | 24,85 | 21,58 | 35,64 | 23,07 | 23,51 | 20,78 |
| Main 1:2 | 31,77 | 28,34 | 29,93 | 33,46 | 30,63 | 32,58 | 39,41 | 30,09 | 25,77 | 30,57 | 24,08 | 22,35 | 36,43 | 23,58 | 23,31 | 20,35 |
| Main 1:2 | 32,77 | 28,58 | 31,77 | 33,83 | 30,5 | 32,55 | >40 | 31,51 | 24,98 | 30,83 | 23,47 | 21,43 | 35,83 | 22,76 | 23,65 | 20,8 |
| Main 1:4 | 31,89 | 29,98 | 30,88 | 34,16 | 29,29 | 31,05 | >40 | 30,86 | 25,76 | 29,93 | 24,24 | 22,64 | 36,21 | 23,64 | 23,12 | 20,42 |
| Main 1:4 | 32,81 | 28,62 | 31,19 | 33,81 | 28,91 | 31,46 | 37,08 | 30,65 | 25,47 | 30,49 | 23,3 | 21,7 | 36,63 | 24 | 23,99 | 20,2 |

DANKSAGUNG

Der erste und herzlichste Dank gilt meiner Mentorin Prof. Dr. Ursula Bilitewski für die Bereitstellung des Promotionsthemas. Ihre stetige und hilfreiche Diskussionsbereitschaft sowie die Unterstützung in allen Bereichen wusste ich im Laufe meiner Arbeit sehr zu schätzen.

Vielen Dank an Prof. Dr. Ludger Beerhues für die freundliche Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Ein großer Dank geht an die Wasserchemische Gesellschaft, Fachgruppe in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, für die finanzielle Unterstützung durch die Vergabe des Wasserstipendiums, ohne das die Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank an Dipl.-Geoökol. Uwe Kunkel und Dr. Michael Radke, Lehrstuhl für Hydrologie der Universität Bayreuth, für die Bereitstellung und Analyse der Wasserproben.

Danke an Dr. Maximiliano Gutierrez, HZI, für die Bereitstellung des p65-GFP Plasmids. Außerdem möchte ich mich bei allen Kollegen des HZI, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken. Besonderer Dank gilt hierbei meinen Thesis Komitee Mitgliedern Dr. H. Hauser & Dr. F. Sasse, sowie den ehemaligen Y2-Flur-Nachbarn und den Mitarbeitern der Array Facility.

Bei meiner Arbeitsgruppe „Biologische Systemanalyse“ (ehemals „Targetidentifizierung“) möchte ich mich für die grandiose Zeit und die super Atmosphäre bedanken. Es gab immer jemanden zum Reden und somit viele wunderbare und hilfreiche Diskussionen.

Herzlichen Dank auch an meine hervorragenden Bürokolleginnen Bianca, Daniela und Katja. Ohne euch wäre es nicht mal halb so schön gewesen.

Danke auch an alle meine Freunde, denn es gibt ein Leben neben der Doktorarbeit.

Meinen Eltern möchte ich meine tiefe Dankbarkeit dafür aussprechen, dass sie mir mein Studium überhaupt ermöglicht haben und immer für mich da sind.

Zu guter Letzt geht ein ganz großes Dankeschön an meine allerbeste Hälfte.